

**Quantifizierung löslicher und zellulärer Biomarker
bei Patienten mit Spondyloarthritis**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Kristina Conrad, geb. Manzke

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
2. PD Dr. Uta Syrbe
3. PD Dr. Thomas Häupl

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2015

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	3
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
3	EINLEITUNG	8
3.1	Spondyloarthritiden.....	8
3.1.1	Epidemiologie.....	9
3.1.2	Diagnose und Klassifikation.....	9
3.1.3	Verlauf und Prognose der axSpA	13
3.1.4	Therapie der axSpA.....	15
3.1.5	Pathophysiologie der Erkrankung.....	15
3.2	Biomarker	17
3.2.1	Definition von Biomarkern.....	17
3.2.2	Prognosefaktoren für Knochenneubildung bei AS	18
3.2.3	Parameter des Knorpel- und Knochen-Metabolismus als mögliche prognostische Biomarker in der axSpA.....	18
3.2.4	Das OPG-RANK-RANKL System	19
3.2.5	Knochenspezifische alkalische Phosphatase.....	20
3.2.6	Wachstumsfaktoren	20
3.2.7	Kollagensynthese und -abbaumarker.....	21
3.2.8	MMP-3.....	23
3.3	Zelluläre und lösliche Entzündungsparameter	24
3.3.1	Lösliche Marker für bakterielle Translokation.....	24
3.3.2	Funktion von humanen Monozyten.....	27
3.3.3	Phänotyp von humanen Monozyten.....	31
3.4	Zielsetzung	33
4	MATERIAL UND METHODEN	34
4.1	Material	34
4.1.1	Patienten und Kontrollen.....	34
4.1.2	Bewertung der Krankheitsaktivität.....	35
4.1.3	Bewertung der Funktionalität.....	37
4.1.4	Bestimmung der röntgenologischen Progression in der Wirbelsäule.....	37
4.1.5	Technische Geräte	38
4.1.6	Verbrauchsmaterialien	38
4.1.7	Chemikalien	39
4.1.8	Verbrauchsmittel	40
4.2	Methoden	42
4.2.1	Quantifizierung löslicher Proteine	42

4.2.2	<i>Nachweis von IL-10 in Stimulations-Überständen.....</i>	43
4.2.3	<i>Nachweis von Markern des Knorpel- und Knochenmetabolismus und Entzündungsmarkern (Biomarkeranalyse) in humanem Blutserum.....</i>	43
4.2.4	<i>Nachweis von Endotoxinen in humanem Blutserum</i>	44
4.2.5	<i>Analytische Durchflusszytometrie</i>	45
4.2.6	<i>Phänotypische Analyse von Monozyten aus humanem Vollblut.....</i>	47
4.2.7	<i>Funktionelle Analyse von Monozyten aus humanem Vollblut.....</i>	48
4.2.8	<i>Software</i>	51
4.2.9	<i>Statistik.....</i>	51
5	ERGEBNISSE	53
5.1	Untersuchung der diagnostischen und prognostischen Bedeutung ausgewählter Serumproteine für axSpA	53
5.1.1	<i>Diagnostische Marker.....</i>	54
5.1.2	<i>Marker für röntgenologische Progression.....</i>	60
5.2	Analyse von Translokationsmarkern und Indikatoren systemischer Immunaktivierung	69
5.2.1	<i>Analyse von potenziellen Translokationsmarkern in Serumproben</i>	70
5.2.2	<i>Untersuchungen zum Phänotyp und der Funktion von Monozyten als mögliche Indikatoren systemischer Immunaktivierung.....</i>	72
6	DISKUSSION	85
6.1	Diagnostische Bedeutung der analysierten Biomarker	85
6.2	Korrelation der Serumkonzentrationen der Biomarker mit Krankheitsaktivität, Entzündung und strukturellen Schäden	88
6.3	Prognostische Bedeutung der analysierten Biomarker.....	92
6.4	Indikatoren für bakterielle Translokation bei SpA-Patienten	98
6.5	<i>In vivo</i> Prä-Aktivierung von Monozyten bei axSpA-Patienten.....	100
7	LITERATURVERZEICHNIS	104
8	ANHANG	121
8.1	Abbildungsverzeichnis	121
8.2	Tabellenverzeichnis	122

1 Zusammenfassung

Die axiale Spondyloarthritis (axSpA) ist eine chronische entzündlich-rheumatische Erkrankung unbekannter Ursache, die durch Entzündungen in den Sakroiliakalgelenken (SIG) und an den Gelenken der Wirbelsäule gekennzeichnet ist. Darüber hinaus kann es im Krankheitsverlauf zu einer Ankylose in den SIG und zur Entwicklung von Syndesmophyten an den Wirbelkörpern kommen, was mit Funktionseinschränkungen in der Beweglichkeit des Achsenskeletts einhergeht und somit neben Schmerz und Entzündung wesentlich zur Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten mit axSpA beiträgt. Da ein Großteil der Patienten mit axSpA auch sub-klinische mukosale Entzündungen aufweist, werden mukosale Antigene als Trigger der Entzündung diskutiert.

Für die Diagnose und Prognose der axSpA existieren bisher wenige serologische Marker mit hoher Sensitivität und Spezifität. Der Nachweis von HLA-B27 wird für die Diagnose der axSpA genutzt, stellt jedoch nur eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer axSpA dar. Die gebräuchlichen Entzündungsparametern BSG und CRP weisen nur eine geringe Sensitivität auf, da nur bei 40-60 % der SpA Patienten erhöhte CRP- und BSG-Konzentrationen nachweisbar sind [1-3]. Auch für die Vorhersage der Entwicklung und des Fortschreiten von strukturellen Veränderungen an der Wirbelsäule stehen bisher nur wenige Marker zur Verfügung.

Ziel dieser Arbeit war daher die Identifikation von Biomarkern, die für die Diagnosestellung und/ oder die Prognose von röntgenologischer Progression in der Wirbelsäule in der klinischen Praxis genutzt werden können. Dazu wurden 13 Proteine, die mit Knorpel- und Knochenumbau oder Entzündung assoziiert sind, in Serumproben von axSpA-Patienten und gesunden Kontrollen mittels ELISA quantitativ analysiert und auf ihr diagnostisches und prognostisches Potenzial hin überprüft. Darüber hinaus wurde im Blut von axSpA-Patienten nach Indikatoren einer möglichen bakteriellen Translokation gesucht und die Konzentrationen von LPS, LBP und IL-6 im Serum quantifiziert. Außerdem erfolgte eine phänotypische und funktionelle Charakterisierung der Monozyten, die als empfindliche Sensoren bakterieller Stimuli gelten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Serumkonzentrationen von CTX-II, BMP-2 und LBP ein hohes diagnostisches Potenzial für die axSpA aufweisen, während die

Serumkonzentrationen von BMP-2, PINP und VEGF und in geringerem Maße auch die Serumkonzentrationen von MMP-3 und NTX-I als Marker für die Vorhersage röntgenologischer Progression geeignet sein könnten. Weiterhin konnten erhöhte LPS-, LBP- und IL-6-Konzentrationen im Serum von axSpA-Patienten nachgewiesen werden, die auf eine Translokation bakterieller Antigene hinweisen können. Die Charakterisierung der Monozyten zeigte erhöhte Frequenzen der pro-inflammatorischen CD14⁺⁺CD16⁻ Subpopulation und einen verminderten Anteil an CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten in Patienten mit axSpA. Die Expression von Oberflächenmolekülen, die für die Erkennung mikrobieller Strukturen, für die Aktivierung oder für die Co-Stimulation notwendig sind, waren bei axSpA-Patienten mit der von Kontrollen vergleichbar.

Funktionell wiesen die Monozyten von axSpA-Patienten eine *in vivo* Präaktivierung mit, im Vergleich zu gesunden Kontrollen, erhöhter spontaner und durch suboptimale bakterielle Stimuli induzierter Freisetzung proinflammatorischer Zytokine bei gleichzeitig verminderter Reaktivität auf LPS *in vitro* auf. Diese Präaktivierung war bei Patienten unter Standardtherapie, d.h. kontinuierlicher und bedarfsweiser NSAR-Einnahme nachweisbar, nicht aber bei Patienten unter TNF-Blocker-Therapie. Interessanterweise bestand bei Patienten unter Standardtherapie ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität, d.h. dem BASDAI und der Frequenz zytokinproduzierender Monozyten. Die Phagozytosekapazität war zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen vergleichbar.

Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit Biomarker mit diagnostischer und prognostischer Bedeutung für die axSpA identifiziert werden. Die Bedeutung dieser Biomarker muss in unabhängigen Kohorten weiter untersucht werden. Der Nachweis erhöhter LPS-Serumkonzentrationen und das Vorhandensein einer *in vivo* Präaktivierung der Monozyten bei axSpA-Patienten unterstützt das Konzept, dass mukosale Antigene pathogenetisch involviert sind. Die Bedeutung der Translokations-Indikatoren und der Monozytenfunktion als potenzielle Biomarker muss in künftigen Untersuchungen weiter analysiert werden.

2 Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Österreich
ANCOVA	<i>ANalysis of CO-VARiances</i>
ANOVA	<i>ANalysis Of VARiances</i>
APZ	<i>Antigen-Präsentierende Zellen</i>
AS	Ankylosierende Spondyloarthritis
ASAS	<i>Assessment of Spondyloarthritis</i>
aTNFa	anti TNF-α
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
axSpA	axiale Spondyloarthritis
BALP	<i>Bone specific ALkaline Phosphatase</i>
BASDAI	<i>Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index</i>
BASFI	<i>Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index</i>
BL	<i>Baseline</i>
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BSG	Blut-Senkungs-Geschwindigkeit
BT	Biologika Therapie
C-Terminus	Carboxylgruppe am Ende eines Proteins
CCL	<i>CC chemokine Ligand (C=cysteine)</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankung
CN	China
Cox	<i>Cyclooxygenase</i>
CRP	C-Reaktives Protein
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4</i>
CTX-II	<i>C-terminal telopeptide of type-2 collagen</i>
D	Deutschland
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
DK	Dänemark
DMARDs	<i>disease modifying anti-rheumatic drugs</i>
E-coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EFW	Endotoxin Freies Wasser
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
ESSG	<i>European Spondyloarthritis Study Group</i>
EU	<i>Endotoxin Units</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FSL	Fibroblasten stimulierendes Lipopeptid
g	Erdbeschleunigung
GESPIC	<i>German Spondyloarthritis Inception Cohorte</i>

gp	Glykoprotein
h	Stunden
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFNγ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1 Rezeptor
IL-1ra	IL-1 Rezeptor Antagonist
iNOS	induzierbare NO-Synthetase
kD	Kilo Dalton
KI	Konfidenz Intervall
KT	klassische Therapie
LAL	Limulus Amöbozyten Lysat
LBP	LPS bindendes Protein
LPS	Lipo-Poly-Saccharid
LR	<i>Likelihood Ratio</i>
M	Molar
m	Milli
M-CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MD-2	Myeloid Differentiation protein -2
MDP	Muramyl dipeptid
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	<i>Matrix Metallo Proteinase</i>
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
mSASSS	<i>modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score</i>
MTX	Methotrexat
n	nano
N-Terminus	Aminogruppe am Ende eines Proteins
n.d.	nicht detektiert
NFkB	Nuclear Factor kappa B
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
NLR	<i>NOD-Like Receptor</i>
nrSpA	nicht röntgenologische Spondyloarthritis
NSAR	nicht-steroidale anti-inflammatorische Rheumatika
NTX-I	<i>N-terminal telopeptide of type-1 collagen</i>
OPG	Osteoprotegerin
OR	<i>Odds Ratio</i>
oxLDL	Oxidiertes <i>Low Density Lipoprotein</i>
p	pico
PAM	tripalmitoyliertes Lipoprotein
PAMP	<i>Pathogen Associated Molekular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	para Formaldehyd
PIINP	<i>Procollagen Type II N-terminal Propeptide</i>
PINP	<i>Procollagen Type I N-terminal Propeptide</i>
pNA	para Nitroanilin

PRR	<i>Pathogen Recognition Receptor</i>
PsA	Psoriasis Arthritis
p-Wert	Signifikanzwert in der Statistik
r	Korrelationskoeffizient
RA	Rheumatoide Arthritis
RANK	<i>Receptor Activator of NFκB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NFκB Ligand</i>
ReA	Reaktive Arthritis
rh	rekombinat human
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
Rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sCD14	<i>soluble CD14</i>
SD	Syndesmophyten
SIG	Sakroiliakalgelenk(e)
Stabw	Standard Abweichung
STIR	<i>Short Term Inversion Recovery</i>
SpA	SpondyloArthritis
sRANKL	<i>soluble Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand</i>
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
T	Temperatur
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor Matrix Protein</i>
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
u.a.	unter anderem
UK	<i>United Kingdom</i>
US	<i>United States</i>
uSpA	undifferenzierte Arthritis
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VF	Verdünnungsfaktor
z.B.	zum Beispiel

3 Einleitung

3.1 Spondyloarthritis

Unter den Spondyloarthritis (SpA) wird eine Gruppe entzündlich-rheumatischer Erkrankungen zusammengefasst, die durch ähnliche klinische Symptome und eine hohe Assoziation mit dem Vorhandensein des humanen Leukozyten-Antigens (HLA)-B27 gekennzeichnet sind. Zu dieser Gruppe zählen die Ankylosierende Spondylitis (AS) der Prototyp der SpA, die Reaktive Arthritis (ReA), die mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) assoziierte Arthritis, die undifferenzierte (u)SpA und die Psoriasis-Arthritis (PsA) [4]. Hauptmanifestationen der SpA sind periphere Arthritis, Enthesitis¹ und Uveitis anterior², sowie axiale Gelenkmanifestationen, wie die Sakroilitis und Spondylitis. In Abhängigkeit von der Hauptmanifestation unterteilt man die SpA in die vorwiegend axiale (ax)SpA und die vorwiegend periphere SpA [5]. Die periphere SpA ist durch eine meist asymmetrisch auftretende periphere Arthritis, Enthesitiden und Daktylitiden³ gekennzeichnet, während die axSpA durch Sakroilitis und Spondylitis charakterisiert wird. Da der Fokus dieser Arbeit auf die axSpA gerichtet war, wird diese Form nachfolgend näher beschrieben.

Zentrales Merkmal der axSpA ist der tief sitzende Rückenschmerz und einer Morgensteifigkeit der unteren Wirbelsäule mit Besserung bei Bewegung, nicht aber bei Ruhe. Zusätzlich können bei Patienten mit axSpA auch periphere Gelenkmanifestationen, wie eine asymmetrische Arthritis vorwiegend der unteren Extremitäten, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), Daktylitis, Enthesitis und Uveitis anterior auftreten[6-8]. Neben der dominanten axialen Entzündung, die im Bereich der Sakroiliakal-Gelenke (SIG), aber auch an der Wirbelsäule auftreten kann, ist die Knochenneubildung in diesen Bereichen ein Hauptmerkmal der Erkrankung. Bei vielen Patienten kommt es im Krankheitsverlauf zur Versteifung (Ankylose) der SIG und im Bereich der Wirbelsäule zur Bildung von Knochenspannen, den sogenannten Syndesmophyten (SD), die zu einer erheblichen Einschränkung der Beweglichkeit der Wirbelsäule führen können. Die Trigger der Entzündung und die Pathomechanismen der Knochenneubildung sind noch weitgehend unklar.

¹ Entzündung an den Sehnenansatzstellen (Übergang zwischen Sehne und Knochen)

² Entzündung der mittleren Augenhaut (Uvea)

³ Entzündung aller Gelenke eines Fingers oder Zehs

3.1.1 Epidemiologie

Die Gesamt-Prävalenz der SpA wird in der kaukasischen Bevölkerung auf 1,5 – 2,0 % geschätzt und liegt für die AS bei 0,5 % [9]. Damit gehören die SpA nach der Rheumatoiden Arthritis zu den häufigsten entzündlich-rheumatischen Gelenkerkrankungen. Die Prävalenz der SpA und insbesondere der AS ist mit der Häufigkeit des HLA-B27 in der Bevölkerung verbunden [10, 11]. In Europa liegt die Prävalenz für HLA-B27 bei 6-9 % [9, 12]. Innerhalb der AS-Patienten in der kaukasischen Bevölkerung sind mehr als 90 % positiv für HLA-B27 und ca. 1,5 % der HLA-B27-Träger entwickeln eine SpA. Somit ist HLA-B27 ein wesentlicher Risikofaktor, wobei andere Gene mit beeinflussen, welche HLA-B27 Träger eine SpA entwickeln [13].

Das mittlere Alter bei Krankheitsbeginn liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Der Symptombeginn liegt häufig 10 Jahre vor der Diagnosestellung. Männer erkranken 2 – 3-mal häufiger an AS als Frauen [1].

3.1.2 Diagnose und Klassifikation

Rückenschmerzen, die das klassische Leitsymptom der axSpA sind, haben eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung. Laut einer Rückenschmerz-Studie des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahre 2009 lag die Stichtagprävalenz von allgemeinen Rückenschmerzen zwischen 32 und 49 %, die Lebenszeitprävalenz lag sogar bei 74 - 85% der Befragten. Es ist somit eine große klinische Herausforderung, Patienten mit axSpA innerhalb der großen Gruppe von Patienten mit Rückenschmerz zu identifizieren. So wurde bereits 1977 von Calin et al. ein Set an Kriterien definiert (Abb. 1), die den bei AS auftretenden Rückenschmerz, den so genannten entzündlichen Rückenschmerz, von unspezifischen und degenerativ bedingten Rückenschmerzen abzugrenzen [8].

Kriterien des entzündlichen Rückenschmerzes (nach Calin et. al 1977)
<ul style="list-style-type: none"> • Krankheitsbeginn vor dem 40. Lebensjahr • Schleichender Beginn der Beschwerden • Dauer seit mindestens 3 Monaten • Besserung bei Bewegung • morgendliches Schmerzmaximum, Morgensteifigkeit der Wirbelsäule
<p>Bewertung: Entzündlicher Rückenschmerz liegt vor, wenn mindestens 4 der 5 Kriterien erfüllt sind</p>

Abbildung 1: Calin-Kriterien für die Klassifikation des entzündlichen Rückenschmerzes (1977)

Neben den klinischen Parametern hilft die Bestimmung von HLA-B27 bei der Diagnosestellung, wobei ein positiver Befund allein, wie oben schon erwähnt, nicht ausreichend für die Diagnosestellung ist. Autoantikörper haben keine Bedeutung in der Diagnostik und eine Erhöhung der Entzündungsparameter wie das C-reaktive Protein (CRP)- und die Blut-Senkungs-Geschwindigkeit (BSG) können nur bei 40 – 60 % der AS-Patienten nachgewiesen werden [1-3]. Somit stehen nur wenige diagnostische serologische Parameter zur Verfügung.

Die Bildgebung spielt daher für die Diagnosestellung eine herausragende Rolle. Für die Diagnose der AS sind dabei röntgenologische Veränderungen im Bereich der SIG, d.h. der Nachweis einer Sakroilitis, entscheidend. Die röntgenologische Sakroilitis ist durch Sklerosierung, Erosion, Gelenkspaltverschmälerung oder –erweiterung und Ankylose gekennzeichnet. Die Veränderungen werden in beiden SIG beurteilt und entsprechend der Kriterien von Bennett et al. [14] in vier Stufen graduiert (Abb. 2).

Röntgenologische Graduierung der Sacroilitis	
Grad 0	keine strukturellen Veränderungen (normal)
Grad 1	verwaschener Gelenkspalt, Pseudoerweiterung, mäßige Sklerosierung
Grad 2	unregelmäßige Gelenkspalterweiterung, ausgeprägte Sklerosierung, Erosionen
Grad 3	Gelenkspalterweiterung oder –verengung, Erosionen
Grad 4	Sklerosierung, partielle oder vollständige Ankylose

Abbildung 2: Kriterien zur Beurteilung der röntgenologischen Sakroilitis (nach Bennett et al.; 1968)

AS wird diagnostiziert bei Vorliegen einer Sakroilitis beidseitig mit Grad 2 (Erosion/Sklerosierung) oder einseitig mit Grad 3 (Gelenkspalterweiterung oder –verengung) oder Grad 4 (partielle oder vollständige Ankylose), sowie typischer klinischer Symptome. Röntgenologische, d.h. knöcherne Veränderungen, treten oft erst nach langjähriger Beschwerdesymptomatik auf.

Die Bildgebung durch die Magnet-Resonanz-Technik MRT bietet den Vorteil, dass auch frühe Stadien der axSpA diagnostiziert werden können, da akute Entzündungen im SIG sichtbar sind, während das Röntgenbild nur chronische Veränderungen der Knochenstruktur als Resultat der Entzündung anzeigt [15]. Typisch für eine Sakroilitis ist der Nachweis eines

Knochenmarködems im Bereich der SIG in der so genannten *Short Term Inversion Recovery* (STIR) Sequenz [16].

Für die Praxis, vor allem aber für die Abgrenzung der SpA von der RA, wurden Klassifikationskriterien erstellt. Die ersten Klassifikationskriterien für die axSpA wurden 1961 auf einem internationalen Symposium in Rom (*Rom-Kriterien*) eingeführt und 1966 in New York (*New-York-Kriterien*) überarbeitet [14, 17]. 1984 wurden die New-York-Kriterien aktualisiert und sind bis heute als *modifizierte New-York-Kriterien* die gebräuchlichste Klassifikationsmethode für die AS [18]. Durch das nun obligate radiologische Kriterium, den Nachweis der röntgenologischen Grad 2 (beidseitig) bzw. Grad 3 oder 4 (einseitig) Sakroilitis, sind diese Kriterien jedoch nicht für die Klassifikation und Diagnose der frühen axSpA geeignet (Abb 3).

Modifizierte New York Kriterien (1984)	
Röntgenologische Parameter	Klinische Parameter
Sakroilitis mindestens Grad 2 beidseitig oder Grad 3-4 einseitig + 1 klinischer Parameter	1. Chronischer tiefsitzender Rückenschmerz mit Morgensteifigkeit ≥ 3 Monate mit Besserung durch Bewegung 2. Bewegungseinschränkung der Lendenwirbelsäule in sagittaler und frontaler Ebene 3. Eingeschränkte Thoraxexkursion (alters- und geschlechtsabhängig)

Abbildung 3: Modifizierte New York Kriterien (1984) für die Klassifikation der AS

Um auch Frühformen der axialen nicht röntgenologischen (nr)SpA klassifizieren zu können wurden 1990 die AMOR- und 1991 die *European Spondyloarthritis Study Group* (ESSG)-Kriterien entwickelt, bei denen die Sakroilitis nur ein mögliches Kriterium darstellt [5, 19]. Zusätzlich zum entzündlichen Rückenschmerz muss noch mindestens ein weiterer SpA-Parameter vorhanden sein. Diese Kriterien können auch für die Klassifikation der peripheren SpA genutzt werden, wenn alternativ zum entzündlichen Rückenschmerz eine asymmetrische oder prädominant an den unteren Extremitäten auftretende Synovitis bei den Patienten vorliegt (Abb. 4).

ESSG Kriterien (1991)		
Entzündlicher Rückenschmerz	oder	Synovitis, asymmetrisch oder prädominant der unteren Extremitäten
+ 1 SpA Parameter		
SpA Parameter: <ol style="list-style-type: none"> 1. Positive Familienanamnese 2. Psoriasis 3. Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa 4. Enthesiopathie 5. Urethritis/Cervicitis oder akute Diarrhoe innerhalb eines Monats vor Beginn der Arthritis 6. Alternierender Gesäßschmerz 		

Abbildung 4: ESSG Kriterien (1991) für die Klassifikation der axSpA (AS und nrSpA) und der peripheren SpA

2009 wurden von der *Assessment of Spondyloarthritis (ASAS) International Society*, einer internationalen Experten-Gruppe auf dem Gebiet der Spondyloarthritis, neue Klassifikationskriterien für die axSpA entwickelt [4]. Diese ASAS-Kriterien definieren die Sakroilitis in der Bildgebung entweder als röntgenologische Sakroilitis oder als Sakroilitis im MRT. Alternativ zur Sakroilitis kann der Nachweis von HLA-B27 als Klassifikationskriterium verwendet werden. Zusätzlich müssen bei Vorhandensein einer Sakroilitis ein und bei Nachweis von HLA-B27 zwei weitere typische SpA Parameter vorliegen (Abb. 5).

ASAS Kriterien (2009)		
Sakroilitis in der Bildgebung (MRT oder Röntgen)	oder	HLA-B27
+ 1 SpA Parameter		+ 2 SpA Parameter
SpA Parameter: <ol style="list-style-type: none"> 1. Positive Familien-Anamnese für SpA 2. Psoriasis 3. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn/ Colitis Ulcerosa) 4. Enthesitis der Ferse 5. Arthritis 6. Uveitis 7. Daktylitis 8. HLA-B27 9. chronischer Rückenschmerz 10. gutes Ansprechen auf NSAR 11. erhöhtes CRP 		

Abbildung 5: ASAS Kriterien für die Klassifikation der axSpA (AS und nrSpA)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Patienten mit axSpA für die Analyse der Biomarker nach den modifizierten New-York-Kriterien als AS-Patienten klassifiziert. Für Patienten, die das röntgenologische Kriterium nicht erfüllten, also nrSpA-Patienten, wurden die ESSG Kriterien angewendet. Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war das Vorhandensein von entzündlichem Rückenschmerz. Die SpA-Parameter wurden um den Nachweis von HLA-B27, Uveitis und Daktylitis erweitert, die später in die ASAS Kriterien aufgenommen wurden (Abb. 5). Die Klassifizierung der axSpA-Patienten für die Analyse der zellulären und löslichen Entzündungsmarker erfolgte nach den ASAS Kriterien.

3.1.3 Verlauf und Prognose der axSpA

Die Krankheitslast wird zum einen durch die akute Rückenschmerz-Symptomatik und zum anderen durch die im Verlauf der Erkrankung auftretende Versteifung bestimmt.

Die Einschränkung der Beweglichkeit wird einerseits von muskulären Verspannungen durch die akute Entzündung verursacht und andererseits durch die im Rahmen der Erkrankung im Beckenbereich auftretende knöcherne Ankylose der SIG. Funktionell bedeutender ist jedoch die bei einem Teil der Patienten auftretende Versteifung der Wirbelsäule. Vor allem nach langjähriger Erkrankung kann es in der Wirbelsäule ebenfalls zu strukturellen Veränderungen kommen. Im Bereich der Wirbelkörperkanten können sklerotische und erosive Veränderungen auftreten, die von einer Knochenneubildung mit Ausbildung von vertikalen Knochenspannen, den so genannten Syndesmophyten (SD), begleitet sein können. Die röntgenologisch nachweisbaren SD führen zu einer irreversiblen Einschränkung der Wirbelsäule in allen Bewegungsebenen.

Zur Quantifizierung der strukturellen Veränderungen an der Wirbelsäule, wird der *modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score* (mSASSS) genutzt.

Anhand von Röntgenbildern (laterale Ansicht) werden die vorderen Kanten von insgesamt 12 Wirbelkörpern von der Unterkante des zweiten Halswirbels bis zur Oberkante des ersten Brustwirbels (C2 – C7 + T1) und von der Unterkante des zwölften Brustwirbels bis zur Oberkante des Kreuzbeins (T12 + L1 – L5 + S) bewertet. Für jede Wirbelkante können zwischen null und drei Punkten vergeben werden. Normale Wirbelkanten erhalten null Punkte, für Erosionen, sklerotische Veränderungen oder die Ausbildung von Kastenwirbeln

wird ein Punkt vergeben, eindeutige Syndesmophytenbildung erhalten 2 Punkte und die vollständige knöcherne Überbrückung von zwei Wirbeln wird mit 3 Punkten bewertet (Abb. 6). Der mSASSS kann Werte zwischen 0 und 72 annehmen, da die Punkte für die Bewertung von 24 Wirbelkörperkanten addiert werden.

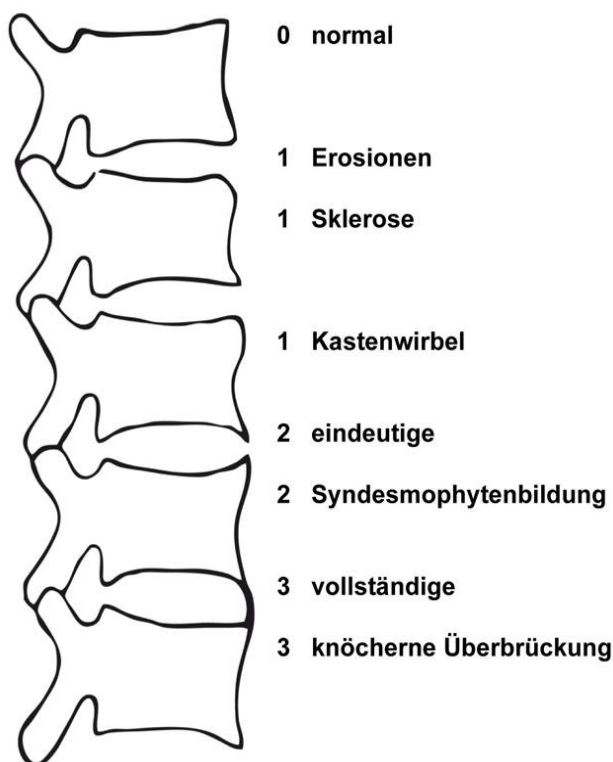


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bewertung struktureller Schäden an den Wirbelkörpern

Strukturelle Veränderungen an den Kanten der Wirbelkörper (Hals- und Lendenwirbelsäule) werden anhand von Röntgenbildern bewertet. Die röntgenologisch sichtbaren Veränderungen werden mit Punkten zwischen 0 (keine Veränderungen) bis 3 (vollständige knöcherne Überbrückung zweier Wirbel) für jede Wirbelkante bewertet und daraus der mSASSS (*modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score*) berechnet.

Der Verlauf der Erkrankung ist individuell sehr unterschiedlich, daher werden klinische und serologische Parameter benötigt, die eine Identifizierung von Patienten mit einem Risiko für Knochenneubildung erlauben. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass Rauchen und das Vorhandensein von SD und erhöhte CRP- und BSG-Konzentrationen unabhängige Variable zur Vorhersage der röntgenologischen Progression darstellen [20-23].

3.1.4 Therapie der axSpA

Bisher gibt es keine kurative Behandlungsmethode für die SpA. Hauptpfeiler der medikamentösen Therapie ist die Anwendung nicht-steroidaler Antirheumatika (NSAR), wie Ibuprofen oder Diclofenac, d.h. nicht-selektiver Cyclooxygenase (Cox)-Inhibitoren, sowie Celecoxib u.a. selektive Cox-Inhibitoren. Bei den meisten Patienten hat die NSAR-Therapie einen hervorragenden Effekt auf die Symptomatik des entzündlichen Rückenschmerzes. Bei unzureichender Wirkung der NSAR werden TNF α -Blocker mit sehr gutem Erfolg angewandt. Die bei der RA häufig angewandten krankheitsmodifizierenden Medikamente (DMARDs *disease modifying anti-rheumatic drugs*) haben keinen Effekt auf die axiale Symptomatik. Bei Vorhandensein einer peripheren Arthritis wird die Gabe von DMARDs empfohlen. Es kommen dann DMARDs wie Methotrexat, Sulfasalzin oder Leflunomid zum Einsatz.

Neben der medikamentösen Therapie hat die Physiotherapie sowohl für die Reduktion von Symptomen als auch für den Erhalt der Beweglichkeit einen hohen Stellenwert.

3.1.5 Pathophysiologie der Erkrankung

Die Pathogenese der SpA ist bisher wenig verstanden. Die Krankheitsentwicklung wird stark durch eine genetische Disposition bestimmt. Genetischer Hauptrisikofaktor ist das Vorhandensein von HLA-B27, der etwa 1/3 der genetischen Disposition erklärt. Der Rest wird durch andere Gene bestimmt [24]. Genomweite Assoziationsstudien zeigten einen Zusammenhang von AS mit Risikovarianten von Genen, die u.a. Zytokin-Signalwege kontrollieren [25, 26].

Obwohl die Assoziation von AS zu HLA-B27 vor mehr als 40 Jahren beschrieben wurde, ist die pathogenetische Rolle von HLA-B27 weiterhin unklar. Es gibt drei Theorien zur Bedeutung von HLA-B27 in der Pathogenese der AS.

Die arthritogene Peptidtheorie, geht davon aus, dass HLA-B27 bestimmte mikrobielle Peptide, die eine Kreuzantigenität zu z.B. Knorpelantigenen aufweisen, an CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Diese greifen als autoreaktive zytotoxische T-Zellen körpereigenes Gewebe an und tragen so zur Pathogenese der AS bei [27].

Die zweite Theorie sieht die Homo-Dimerisierung der schweren Ketten von HLA-B27 als pathogenetisch bedeutsam an. Das HLA-B27-Molekül weist eine hohe Fehlfaltungsrate auf, was zur Akkumulation und nachfolgenden Dimerisierung von schweren HLA-B27-Ketten führt. Diese ungewöhnlichen Dimere können von NK- und CD4⁺ T-Zellen erkannt werden und eine Immunreaktion initiieren [28, 29].

Auch die dritte Theorie bezieht sich auf die Fehlfaltung der schweren Kette von HLA-B27. Un- oder fehlgefaltete Proteine werden normalerweise im Proteasom im Zytosol degradiert. Eine Akkumulation dieser Proteine im Endoplasmatischen Retikulum führt zu einem *Unfolded Protein Stress*, der eine überschießende oder aberante Immunantwort zur Folge haben kann [30, 31].

Als initialer Auslöser der Entzündung werden bakterielle Infektionen angenommen, jedoch konnten bislang keine bakteriellen Antigene in den entzündeten Gelenken bei AS-Patienten nachgewiesen werden [32]. In histologischen Studien konnte in Biopsien aus entzündlichen Bereichen des SIG eine Anreicherung von Makrophagen, T-Zellen und Zytokinen, vor allem TNF- α , in den Infiltraten gezeigt werden [33, 34]. Auch systemisch wurden erhöhte TNF- α Konzentrationen im Serum von AS-Patienten nachgewiesen.[35].

Im Tiermodell, d.h. im HLA-B27-transgenen Rattenmodell, wurde gezeigt, dass eine gesunde Darmflora für die Auslösung der axialen Entzündung notwendig ist [36-38]. Gastroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass Entzündungen der Darmmukosa eine wichtige Rolle in der Pathogenese der SpA spielen. Mehr als 60 % der SpA Patienten zeigten intestinale Entzündungszeichen ohne klinische Symptome [39-43]. In einer Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Remission, bzw. Persistenz der Entzündung im Gelenk und im Darm gezeigt werden [44]. Daher wird angenommen, dass mukosale Antigene einen Trigger der Erkrankung darstellen können [39]. Diese Hypothese wird durch frühere Ergebnisse der AG Sieper unterstützt, in der eine erhöhte T-Zellreaktivität gegen mukosale Antigene in entzündeten Gelenken von SpA-Patienten gezeigt wurde [45].

3.2 Biomarker

Ziel der Arbeit war es diagnostische und prognostische Biomarker in einer Kohorte von Patienten mit axSpA zu identifizieren, mit besonderem Fokus auf serologische und zelluläre Biomarker. Es wurden sowohl Entzündungsmediatoren als auch Parameter des Knochen- und Knorpelmetabolismus auf ihre diagnostische und prognostische Kapazität hin untersucht.

3.2.1 Definition von Biomarkern

Als Biomarker werden alle objektiv messbaren Parameter bezeichnet. Dabei kann es sich um zelluläre, biochemische oder molekulare Substanzen sowie physiologische Parameter, die durch physikalische (z.B. Blutdruck) oder technische Verfahren (z.B. Sonografie) messbar sind, handeln [46, 47]. Neben der Quantifizierbarkeit muss der Biomarker auch eine klinische Relevanz aufweisen.

Mit Hilfe diagnostischer Biomarkern sollen normale biologische Prozesse von krankhaften Veränderungen unterschieden werden [46, 47]. Die klinische Validität eines diagnostischen Biomarkers gibt dabei an, mit welcher Sensitivität und Spezifität die Krankheit erkannt wird. Anhand prognostischer Biomarker soll der Krankheitsverlauf individuell vorhergesagt werden können [46, 47]. Zu diesen Biomarkern zählen auch Risikofaktoren (z.B. genetische Prädisposition; Rauchen), die den Krankheitsverlauf beeinflussen können. Durch die Nutzung prädiktiver Biomarker soll die Wahrscheinlichkeit eines Therapieerfolgs eingeschätzt werden [46, 47]. Im Idealfall können die Art, Dosis und Dauer der Medikation an den Patienten angepasst und mögliche Nebenwirkungen minimiert werden.

Für die Anwendung eines Biomarkers in der klinischen Praxis muss das Probenmaterial schnell und einfach verfügbar und der Nachweis sensitiv, spezifisch und technisch zuverlässig sein. Daher muss die Validität jedes Biomarkers in klinischen Studien evaluiert werden [46]. Der erste Schritt ist hierbei die Identifikation potenzieller Biomarker und die Etablierung eines Nachweisverfahrens.

3.2.2 Prognosefaktoren für Knochenneubildung bei AS

Frühere Studien haben gezeigt, dass das Vorhandensein von Syndesmophyten, ein erhöhter CRP-Wert und Rauchen mit Knochenneubildung assoziiert sind [20, 23]. Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere prognostische Biomarker identifiziert werden, die es erlauben, Patienten mit schnellem Fortschreiten der Knochenneubildung im Bereich der Wirbelsäule zu identifizieren. Es wurden einerseits Entzündungsmarker und andererseits Knochen- und Knorpelmarker auf ihre prognostische Kapazität hin untersucht.

Des Weiteren wurden systemisch messbare Knorpel- und Knochenparameter ausgewählt, die die lokalen strukturellen Veränderungen bei Patienten mit axSpA, insbesondere der Knochenneubildung, widerspiegeln sollen. Die Bestimmung serologischer und zellulärer Entzündungsmarker erfolgte unter der Vorstellung, dass bei der axSpA initial entzündliche Veränderungen im Vordergrund stehen und es einen sensitiveren Parameter als CRP oder BSG gibt, der die Abgrenzung von Patienten mit entzündlichem von z.B. mechanisch bedingtem Rückenschmerz erlaubt.

3.2.3 Parameter des Knorpel- und Knochen-Metabolismus als mögliche prognostische Biomarker in der axSpA

Der Knochen ist sowohl ein statisches als auch ein dynamisches Organ. Knochengewebe besteht zu 70 % aus anorganischen (Kalziumphosphat und Hydroxylapatit) und zu 30 % aus organischen (kollagene und nicht-kollagene Proteine) Substanzen, die als extrazelluläre Matrix bezeichnet werden. Für die Synthese und Mineralisierung der Knochenmatrix sind die Osteoblasten und Osteozyten zuständig, während beschädigtes oder alterndes Knochengewebe von Osteoklasten abgebaut wird. Das Skelett ist ein metabolisch aktives Organ und der Knochenumbau findet lebenslang statt [48].

Das Knorpelgewebe ist ein festes aber flexibles und druckelastisches Gewebe. Speziell der Gelenkknorpel sorgt für eine reibungsfreie Beweglichkeit des Gelenks, sowie für einen Druckausgleich bei Stößen. Knorpel besteht aus den Matrix-synthetisierenden Chondroblasten und den darin eingebetteten Chondrozyten. Die Knorpelmatrix setzt sich aus Kollagenfibrillen und Proteoglykanen zusammen und kann viel Wasser binden. Im Gegensatz zum Knochengewebe ist das Knorpelgewebe gefäßlos und wird über Diffusion und der

Gelenkknorpel über die Gelenkflüssigkeit versorgt. Bei Erwachsenen ist das Regenerations-Potenzial des Knorpels nach Verletzungen oder Abnutzung eingeschränkt. Größere Knorpeldefekte werden durch Reparaturgewebe aufgefüllt, das jedoch veränderte Eigenschaften aufweist [48, 49].

Knochenneubildung kann prinzipiell über zwei Wege erfolgen: die endochondrale und die membranöse (direkte) Ossifikation. Bei der endochondralen Ossifikation vollzieht sich die Knochenneubildung über eine initiale Knorpelbildung. Hypertrophe Chondrozyten initiieren die Mineralisierung des Knorpels. Es kommt zur Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen) begleitet vom Einstrom neuer Mesenchymzellen. Diese differenzieren zu Osteoblasten, die die Knorpelmatrix mineralisieren. Bei der direkten Ossifikation erfolgt die Knochenbildung durch die Osteoblasten selbst ohne den Zwischenschritt der Chondrozytenhypertrophie [50]. Bisher ist der Mechanismus, der zur pathologischen Knochen-Neubildung in der Wirbelsäule (Syndesmophyten) oder in den Sakroiliakalgelenken (Ankylose) bei axSpA-Patienten führt, noch nicht aufgeklärt. Kontrovers diskutiert wird, ob sowohl die endochondrale als auch die direkte Ossifikation zur Knochen-Neubildung bei der SpA beitragen [51-53]. Eigene unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe unterstützen eine besondere Bedeutung der direkten Ossifikation.

Unter physiologischen Bedingungen stehen anabole und katabole Prozesse im Knorpel- und Knochengewebe im Gleichgewicht. Der Prozess des Abbaus gealterten oder durch Mikrofissuren geschädigten und Aufbau neuen Knorpel- und Knochengewebes wird als *Remodelling* bezeichnet [54]. Der Knorpel- und Knochenstoffwechsel kann durch spezifische Serum-Marker erfasst werden und spiegelt die Aktivität der Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten wider.

3.2.4 Das OPG-RANK-RANKL System

Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen. Ihre Differenzierung und Aktivität ist durch die Bindung von Vitamin D, Glukokortikoiden, Parathormonen, Prostaglandinen u.a. an den *Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand* (RANKL) reguliert. RANKL existiert membrangebunden auf der Oberfläche der Osteoblasten und wird auch in löslicher Form als *soluble* (s)RANKL von Osteoblasten, aktivierten T-Zellen, synovialen Fibroblasten und Knochenmarks-Stromazellen sekretiert [55].

Osteoklasten sind hämatopoetischen Ursprungs und schon die Pre-Osteoklasten tragen auf ihrer Oberfläche den *Receptor Activator of Nuklear Factor kappa B* (RANK), den Rezeptor für RANKL. Eine Interaktion von RANK mit löslichem oder zellgebundenem RANKL ist für ihre Differenzierung zu reifen Osteoklasten notwendig [56].

Osteoprotegerin (OPG) ist ein lösliches Glykoprotein, das hauptsächlich von reifen Osteoblasten und Stromazellen produziert wird. OPG agiert als löslicher *Decoy*-Rezeptor und kann sRANKL binden und neutralisieren und so die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten vermindern [16, 57].

3.2.5 Knochenspezifische alkalische Phosphatase

Die *Bone-specific Alkaline Phosphatase* (BALP) ist ein membranständiges Ektoenzym der Osteoblasten, das im alkalischen Milieu aktiv ist. Dieses Enzym fördert den Knochenaufbau und die Mineralisierung der Knochenmatrix. BALP spaltet organische Phosphatester und setzt dadurch anorganisches Phosphat frei. Die höchste BALP Aktivität wurde während der Mineralisierung nachgewiesen. Der genaue Mechanismus wie BALP zur Mineralisierung beiträgt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt [58, 59]. Bei einer gesteigerten Synthese extrazellulärer Matrix wird BALP von der Zelloberfläche durch Phospholipase C und D freigesetzt, wodurch die Konzentration im Serum ansteigt. Der Nachweis von BALP im Serum kann als Marker für die Knochenneubildungsrate betrachtet werden.

3.2.6 Wachstumsfaktoren

3.2.6.1 BMPs

Die *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) gehören zur Superfamilie des *Transforming Growth Factor- β* (TGF β), zu der 47 verschiedene BMPs gehören. Es handelt sich um parakrine Wachstumsfaktoren, die sowohl auf die Chondrogenese als auch die Osteogenese anabol wirken. Sie steuern als pleiotrophe Morphogene multiple Prozesse des Zellwachstums, der Apoptose, der Zelldifferenzierung und der Chemotaxis, sowohl im Verlauf der Embryogenese als auch im adulten Organismus während des Gewebeumbaus. BMP-2 und BMP-7 werden in Osteoblasten exprimiert und ihre Antagonisten Noggin, Chordin und Gremlin scheinen für die Feinjustierung der BMP-Signaltransduktion in

Osteoblasten zuständig zu sein [60, 61] BMP-2 stimuliert die Pro-Kollagen-II- und Proteoglykan-Synthese und inhibiert die Expression verschiedener Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) bei gleichzeitiger Induktion der *Tissue Inhibitor Matrix Protein* (TIMP)-1 Expression [62, 63]. BMP-7 stimuliert ebenfalls die Pro-Kollagen-II Synthese und zusätzlich die Hyaluronsäure-Synthese in den Chondrozyten [64].

In verschiedenen Tierexperimenten konnte die anabole Wirkung der BMPs gezeigt werden. So führte die Injektion von BMP-2 und BMP-7 zur Knorpelheilung [65]. Rekombinant hergestelltes humanes (rh)BMP-7 wurde als erstes BMP für den klinischen Einsatz zur Regeneration des Knochens nach Frakturen zugelassen [66]. Das rhBMP-2 wirkt konzentrationsabhängig; hohe Konzentrationen führten zu überschießender Knochenbildung [67]. Darüber hinaus induzierte rhBMP-2 auch die Formation von Osteoklasten sowie die Aktivierung reifer Osteoklasten [68].

3.2.6.2 VEGF

Der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) wird von einer Vielzahl von Zellen produziert und wirkt ausschließlich als Wachstumsfaktor auf Endothelzellen [69, 70]. Er spielt eine wichtige Rolle bei der Vaskularisierung während der Embryonalentwicklung, bei der Angiogenese während Reparaturprozessen aber auch bei der Tumorentstehung [44]. VEGF ist auch an der Knochen- und Knorpelentwicklung und ist wesentlich an der Knochenneubildung beteiligt, besonders an der enchondralen Ossifikation. Es ist notwendig für die Verknüpfung von Angiogenese und Osteogenese [70, 71]. Mechanischer Stress, Prostaglandin E, BMP-2/ -4 und -6 sowie pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α können die Synthese und Sekretion von VEGF erhöhen [69, 72-75]. Ebenso kann VEGF die Produktion von TNF- α , IL-6 und IL-8 stimulieren und dadurch zur Aufrechterhaltung der Entzündung im Gelenk beitragen [69].

3.2.7 Kollagensynthese und -abbaumarker

Innerhalb der Kollagenfamilie sind bislang 28 verschiedene Typen bekannt [76, 77]. Kollagene sind essentielle Bestandteile der Kollagenfibrillen der Knochen- und Knorpelmatrix. In die Knochenmatrix wird hauptsächlich das Typ-I Kollagen (90 % des

Knochenproteins) eingebaut, während die Knorpelmatrix überwiegend das Typ-II Kollagen (90 % der wasserunlöslichen Knorpelfasern) beinhaltet. Der Kollagenaufbau und -abbau ist ein normaler physiologischer Prozess zur Regeneration gealterter oder beschädigter Kollagenfasern. Pathologisch veränderte Konzentrationen von Markern des Kollagenumbaus können Hinweise auf verschiedene Erkrankungen geben [48].

Die Vorstufe des Kollagens, Pro-Kollagen, wird im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und im Golgi-Apparat glykosyliert. Die Reifung des Pro-Kollagens zu wasserunlöslichem Tropokollagen findet extrazellulär statt. Dabei wird im nicht-helikalen Bereich am amino (N)- und carboxy (C)-terminalen Ende des Pro-Kollagens in äquimolaren Mengen das Pro-Peptid vom Pro-Kollagen enzymatisch abgespalten [78]. Diese Spaltprodukte werden als Marker der Kollagensynthese genutzt.

Procollagen Type I N-terminal Propeptide (PINP) entsteht bei der Reifung des Typ-I Pro-Kollagens und wird als indirektes Maß für die Knochen-Neubildung verwendet. Obwohl Typ-1 Kollagen auch in anderen Strukturen vorkommt, ist der Kollagen-Metabolismus in diesen Geweben zu gering, um einen messbaren Einfluss auf die Konzentration im Serum zu nehmen. *Procollagen Type II N-terminal Propeptide* (PIINP) entsteht bei der Reifung des Typ-2 Pro-Kollagens und wird als Marker für die Knorpel-Neubildung verwendet.

Am Abbau des Kollagens sind verschiedene Enzyme beteiligt. Cathepsin-K spaltet sowohl Kollagen I als auch II im helikalen Bereich am N-terminalen Ende. MMPs können nur in nicht-helikalen Bereichen aktiv werden [79]. Der Abbau der organischen Knochen- und Knorpelmatrix erfolgt durch Osteoklasten. Beim Abbau der Kollagenfasern entstehen verschiedene Spaltprodukte, die in Serum oder Urin messbar sind. Neben den linearen Fragmenten des helikalen Bereichs finden sich auch so genannte *Crosslinks* der abgebauten Telopectide, die noch über Querverbindungen mit den Peptiden verknüpft sind. Diese Kollagenabbauprodukte dienen als Maß für den Knochen- oder Knorpelabbau.

N-terminal telopeptide of type-I collagen (NTX-I) entsteht durch die Cathepsin-K vermittelte Abspaltung vom Typ-I Kollagen am N-terminalen Ende und dient als Abbaumarker des Typ-I Kollagens [23]. *C-terminal telopeptide of type-II collagen* (CTX-II) entsteht durch die MMP-vermittelte Abspaltung von Typ-II Kollagen am C-terminalen Ende und dient als Abbaumarker des Typ-II Kollagens [39].

3.2.8 MMP-3

Die Familie der MMPs umfasst 25 verschiedene Arten. Sie spielen u.a. eine Rolle bei Geweberegeneration, Wundheilung und der Angiogenese [1]. In den meisten Fällen werden MMPs als inaktive Vorstufen (Zymogene) sekretiert oder in der Zellmembran verankert und durch Proteinasen aktiviert. MMPs können während Reparatur- oder Umbauprozessen in erkrankten oder entzündeten Geweben, jedoch nicht in gesunden Geweben, nachgewiesen werden [80].

MMP-3 gehört zur Familie der Zink-abhängigen Endopeptidasen, die Proteine der extrazellulären Matrix abbauen. Als Substrate werden die Kollagene III, IV, IX und X sowie die meisten Matrix-Proteine und Proteoglykane wie Fibronectin, Aggrecan, Gelatin, Elastin und Fibrinogen beschrieben. Darüber hinaus kann MMP-3 eine Reihe inaktiver Vorstufen von Enzymen (proMMP-1, -9 und -13), Zytokinen (proTNF- α und proTGF- β), Chemokinen (CCL-7) und Wachstumsfaktoren (VEGF) aktivieren [81-83]. Durch die Aktivierung der Kollagenasen MMP-1 und -13 trägt MMP-3 indirekt zum Abbau von Kollagen Typ I + II bei.

Im Gelenk wird MMP-3 von verschiedenen Zelltypen z.B. Makrophagen, Fibroblasten und Chondrozyten gebildet. Bei Patienten mit peripheren Gelenkentzündungen, wie RA korreliert die Serum-Konzentration von MMP-3 mit der Krankheitsaktivität [84-87].

3.3 Zelluläre und lösliche Entzündungsparameter

Neben der Bestimmung von Knochen- und Knorpelmarkern für die Prognose struktureller Wirbelsäulenveränderungen bei axSpA-Patienten sollen zelluläre und lösliche Entzündungsparameter identifiziert werden, die eine Abgrenzung von Patienten mit axSpA gegenüber gesunden Kontrollen erlauben.

Da bei Patienten mit axSpA häufig eine mukosale Entzündung beobachtet wird [39], sollen zum einen Translokationsmarker evaluiert und zum anderen die Funktionalität und der Phänotyp von Monozyten als zirkulierende Sensoren von Endotoxinen untersucht werden.

3.3.1 Lösliche Marker für bakterielle Translokation

Lipopolysaccharide (LPS) bilden den Hauptbestandteil der äußeren Membran der Zellwand von gram-negativen Bakterien. LPS besteht aus einem Glycerin-Lipid (Lipid A), das in der Zellmembran verankert ist und verschiedenen Polysaccharid-Ketten [88]. LPS wird beim Tod von Bakterien freigesetzt und wirkt als Endotoxin auf den Organismus. Im Menschen führen Endotoxine zu lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen, die durch die Aktivierung von Signalkaskaden in Zellen des angeborenen Immunsystems, vor allen in Monozyten, vermittelt werden. Für die Erkennung der bakteriellen Strukturen (*Pathogen Associated Molecular Pattern* - PAMP) ist der Polysaccharidanteil verantwortlich, die Wirkung als Endotoxin wird durch die Lipid-A Komponente vermittelt [88].

Für die Erkennung von PAMPs stehen spezielle *Pathogen Recognition Receptors* (PRRs) zur Verfügung. Zu diesen gehören u.a. die *Toll-Like-Rezeptoren* (TLR), die überwiegend auf der Membran von Immunzellen (Monozyten, T- und B-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen) vorkommen oder intrazellulär auf der luminalen Seite von Vesikeln (Endosomen) lokalisiert sind. [89]. Bis heute sind zehn verschiedene humane TLRs mit einer Vielzahl an exogenen und endogenen Liganden bekannt. Die meisten TLRs bilden Homodimere. Eine Heterodimerisierung mit anderen TLRs oder Co-Rezeptoren kann die Spezifität gegenüber verschiedenen Liganden erhöhen [90].

Der TLR-2 bindet in Kombination mit TLR-1 triacylierte, in Kombination mit TLR-6 diacylierte Lipoproteine. TLR-4 bildet zusammen mit seinem Co-Rezeptor CD14 und mit dem Adaptermolekül *Myeloid differentiation protein – 2* (MD-2) einen Rezeptorkomplex und

erkennt LPS (gram- Bakterien) und virale Glykoproteine ebenso wie eine Reihe endogener Substanzen (oxidiertes *Low Density Lipoprotein* [oxLDL], Fibronektin, Hyaluronfragmente, Laktoferrin u.a.) [90]. Die spezifische Ligandenbindung an den TLR aktiviert eine intrazelluläre Signalkaskade, die zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führt [89].

Eine weitere Klasse der PRR stellen die *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* (NOD)-Like-Receptors (NLRs) dar. Die NLR-Familie umfasst 22 verschiedene Proteine, die intrazelluläre Sensoren für PAMPs darstellen [91]. NLRs werden vor allem im Zytosol oder vesikulär assoziiert in Immunzellen gefunden. Zu den NLRs gehören NOD-1 und NOD-2, deren Ligation die Bildung antimikrobieller Peptide und Stickoxide, sowie pro-inflammatorischer Zytokine induziert [92]. Beide NOD-Rezeptoren erkennen Peptidoglykan-Derivate; NOD-1 erkennt Diaminopimelinsäure von gram-negativen Bakterien, NOD-2 erkennt Muramyl-dipeptide (MDP) von gram-positiven und gram-negativen Bakterien [93].

Freies LPS wird durch spezielle Proteine zum LPS-Rezeptor transportiert. Zu diesen Transportproteinen gehören das LPS bindende Protein (LBP) und das lösliche (*soluble*) sCD14 [94, 95]. LPS wird an LBP gebunden und zu membrangebundenem (m)CD14 auf der Oberfläche von Monozyten/ Makrophagen transportiert. CD14 teilt LPS-Aggregate in Monomere und präsentiert es dem MD2/*toll-like receptor* (TLR)-4-Komplex, der für die Signalweiterleitung in die Zelle und die Synthese und Sekretion von inflammatorischen Zytokinen notwendig ist [96] (Abb 7A). LBP kann außerdem LPS auf sCD14 übertragen. Ebenso wurde ein Transfer von LPS, das bereits an mCD14 gebunden war, zu sCD14 beschrieben [97]. Der LPS/ sCD14-Komplex kann nun auch Zellen aktivieren, die kein CD14 auf der Oberfläche tragen [98].

Neben der Aktivierung können LBP und sCD14 auch zur Inaktivierung von LPS beitragen. Beide Transportproteine können LPS an Lipoproteine im Serum binden und so die Aktivierung von Monozyten/ Makrophagen inhibieren [97]. Die Funktion von LBP ist dabei stark konzentrationsabhängig. Niedrige LBP-Konzentrationen führen zur Aktivierung der Zellen durch die Bindung von LPS an CD14 mit nachfolgender Aktivierung des MD-2/ TLR-4-Komplexes. Hohe LBP-Konzentrationen inaktivieren LPS durch Übertragung auf Plasma-Lipoproteine oder durch Bildung von großen LPS-LBP-Aggregaten und deren Internalisierung via CD14 ohne Aktivierung von MD2/ TLR-4 [97] (Abb. 7B).

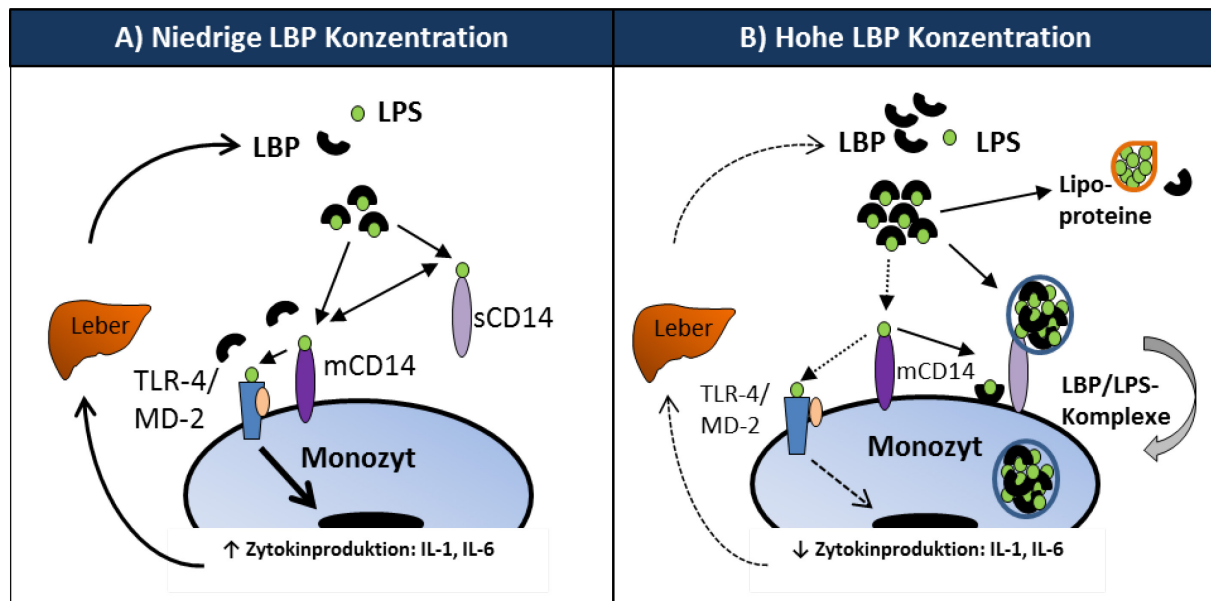


Abbildung 7: Die duale Rolle von LBP als Transportprotein für LPS

In niedrigen Konzentrationen dient LBP vorwiegend als Transportprotein für LPS. Gebundenes LPS wird direkt oder über sCD14 auf mCD14 auf der Zelloberfläche von Monozyten übertragen. Zusammen mit MD2/*Toll-Like-Receptor* (TLR)-4 bildet CD14 einen LPS-Rezeptorkomplex, der für die Signalweiterleitung in die Zelle und die Synthese und Sekretion von inflammatorischen Zytokinen notwendig ist. Diese Zytokine induzieren in der Leber die Produktion der Akut-Phase-Proteine und erhöhen die Serumkonzentration von LBP (A).

Hohe LBP-Konzentrationen wirken auf Monozyten inhibierend. Zum einen bilden sich große LBP-LPS-Komplexe, die nach der Bindung an mCD14 internalisiert und abgebaut werden, zum anderen überträgt LBP das gebundene LPS an Lipoproteine und entfernt es so aus der Peripherie. Ein weiterer Mechanismus ist die Entfernung von bereits gebundenem LPS von mCD14, entweder durch LBP oder durch sCD14. Dadurch wird die Signaltransduktion in die Zelle vermindert und die Produktion von Zytokinen und im weiteren von Akut-Phase-Proteinen reduziert (B).

LBP und sCD14 gehören ebenso wie das C-reaktive Protein (CRP) zu den Akutphase-Proteinen. LBP wird hauptsächlich von den Hepatozyten der Leber [99, 100], aber auch von intestinalen Epithelzellen [101] synthetisiert. Für sCD14 wurde sowohl die Synthese in der Leber [102] als auch die enzymatische Abspaltung von der Zelloberfläche beschrieben [103, 104]. Die LBP- und die sCD14-Synthese wird durch IL-1 und IL-6 vermittelt [105].

Da Monozyten CD14 und auch TLR-4 exprimieren, sind sie die hauptsächlichen Erkennungszellen von LPS. Sie werden durch LPS aktiviert und sind wesentlich an der Einleitung der Immunantwort beteiligt. Die Aktivierung von Monozyten durch LPS führt u.a. zur Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, TNF- α und IL-6.

3.3.2 Funktion von humanen Monozyten

Monozyten stellen ca. 10 % der peripheren Leukozyten im humanen Vollblut dar [106]. Sie gehören zum angeborenen Immunsystem und erkennen über ein breites Rezeptor-Repertoire *PAMPs* und mit Schädigung assoziierte molekulare Muster (*Damage Associated Molecular Pattern - DAMP*) [106, 107]. Monozyten entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks und zirkulieren für 1-3 Tage im Blut [107]. Von dort migrieren sie in verschiedene Gewebe und differenzieren in Abhängigkeit vorhandener Wachstumsfaktoren zu Makrophagen, Dendritischen Zellen oder Osteoklasten aus [108, 109]. Neben diesem Prozess der Homöostase werden Monozyten auch in infizierte und entzündliche Gewebe rekrutiert um dort ihre antimikrobiellen Funktionen auszuüben [106, 110, 111].

Die Bindung pathogener Strukturen an die entsprechenden Rezeptoren führt zu einer Signalweiterleitung in die Zelle und über eine komplexe Signalkaskade zur Translokation von Transkriptionsfaktoren wie NFκB in den Zellkern. Dadurch wird die Gen-Expression von u.a. pro- und im weiteren Verlauf anti-inflammatorischen Zytokinen induziert.

3.3.2.1 Zytokinproduktion

Zytokine gehören zu einer heterogenen Gruppe von 8-60 kD großen Polypeptiden, die hauptsächlich von den Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems als Reaktion auf mikrobielle Pathogene produziert werden. Die meisten Zytokine werden von den Zellen sekretiert; es gibt jedoch auch einige membrangebundene Zytokine [112]. Das Wirkspektrum von Zytokinen umfasst die Regulation von Wachstum, Differenzierung und Funktionsweise verschiedener Zelltypen und beeinflusst maßgeblich Entzündungsprozesse. Die Effekte von Zytokinen überlappen sich (Redundanz) und können auf verschiedene Zellen unterschiedlich wirken (Pleiotropie) [112].

Monozyten gehören zum angeborenen Immunsystem und sekretieren nach der Erkennung pathogener Strukturen pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-1β und IL-6. Darüber hinaus produzieren sie das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 und den IL-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1ra) [113].

Tumor Nekrose Faktor alpha TNF α

TNF- α wird als nicht-glykosyliertes Transmembranprotein (26 kD) gebildet und kann durch die Metalloproteinase *TNF- α Converting Enzyme (TACE)* in die lösliche Form (17 kD) überführt werden. Für die biologische Aktivität ist die Bildung von Homo-Trimeren (52 kD) notwendig [4, 114]

Aktivierte Monozyten und Makrophagen sind die Hauptproduzenten von TNF- α , aber auch andere Zelltypen (Lymphozyten, Dendritische Zellen, Granulozyten, Synoviozyten und Fibroblasten) sind zur Synthese befähigt [115]. Bakteriellendes Endotoxin (LPS) ist der stärkste Stimulus für die TNF- α Synthese und kann zusätzlich durch Zytokine (IL-1 und IFN γ), Tumorzellen, Komplement, Sauerstoffmetabolite erhöht oder durch TGF- β , Prostaglandin E2, Dexamethason u.a. inhibiert werden [116].

Für die Bindung von TNF- α stehen zwei verschiedene, hoch affine Rezeptoren zur Verfügung. TNF-RI wird konstitutiv von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Die Bindung von sowohl löslichem als auch membrangebundenem TNF- α ist irreversibel und führt zu einer primär pro-inflammatorischen Antwort aber auch zur Apoptose. Die Expression von TNF-RII ist induzierbar und auf Immun- und Endothelzellen beschränkt. TNF-RII kann nur durch Zell-Zell-Kontakt, also die Bindung an membranöses TNF α , vollständig aktiviert werden [117-119].

Zur biologischen Aktivität von TNF- α gehört die Fähigkeit die Synthese anderer Zytokine wie IL-1, Chemokine und Akut-Phase-Proteinen zu induzieren [120]. Zusätzlich reguliert TNF α die Bildung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, vermittelt die T-Zellaktivierung durch Dendritische Zellen und erhöht die Funktion zytotoxischer T-Zellen und steigert die Synthese von Stickoxiden, Prostaglandinen und Lymphotoxinen.

Erhöhte TNF- α Konzentrationen wurden bei einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen wie RA, PsA, SpA und CED (z.B. Morbus Crohn) nachgewiesen [121, 122]. In den letzten Jahren wurden erfolgreich verschiedene TNF- α Inhibitoren in der klinischen Praxis zur Behandlung der Spondyloarthritis angewandt [123-130].

IL-1 β und IL-1ra

IL-1 β wird als inaktive Vorstufe Pro-IL-1 β (31 kD) im Zytoplasma produziert und mittels katalytischer Spaltung durch Caspase-1 in einem Multi-Protein-Komplex (Inflammasom) in

seine aktive Form (17 kD) umgewandelt [131]. IL-1 β wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und Keratinozyten produziert [132, 133]. Es existiert ein natürlicher Antagonist IL-1ra, der hauptsächlich von Monozyten und neutrophilen Granulozyten sezerniert wird und um die Bindung am IL-1-Rezeptor konkurriert [134]. IL-1 β fördert den Entzündungsprozess und die Beseitigung der Pathogene, indem es die Expression von IL-6 und TNF α induziert, eine Neutrophilie verursacht und die Expression von Adhäsionsmolekülen und damit die Migration von Immunzellen in entzündliche Gewebe reguliert [20]. Ebenso wie TNF α induziert IL-1 β in den Hepatozyten die Produktion von Akut-Phase-Proteinen [135].

IL-1 β spielt bei destruktiven Gelenk- und Knochenerkrankungen eine Rolle, da es aktiv an der Gewebeschädigung durch die Induktion der Enzyme COX-2 und der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) beteiligt ist. Außerdem induziert IL-1 β die Proliferation von Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen, aktiviert Osteoklasten und erhöht die Sekretion von Metalloproteinasen. Neben diesen katabolen Effekten ist IL-1 β aber auch an der Geweberegeneration beteiligt, indem es den Wiederaufbau der extrazellulären Matrix fördert [20, 136, 137].

Eine Blockade von IL-1 β kann die vorwiegend destruktive Aktivität vermindern. So wird in der rheumatologischen Praxis der IL-1 Rezeptor-Antagonist Anakinra (als Kombinationstherapie mit Methotrexat (MTX)) für die Behandlung der RA erfolgreich eingesetzt [138-140]. Die Behandlung von axSpA-Patienten mit Anakinra war nur wenig effektiv im Vergleich zur Behandlung mit TNF- α Inhibitoren [141].

IL-6

Bei IL-6 handelt es sich um ein Glykoprotein (21-26 kD) mit pleiotropher Wirkung. Es wird hauptsächlich von aktivierten Monozyten, Makrophagen und aktivierten T-Zellen, aber auch von Fibroblasten, Mastzellen, Epithel- und Endothelzellen produziert [112]. Die Transkription wird durch bakterielle Endotoxine und pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1 β und TNF α , aber auch durch IL-6 selbst, induziert [142]. Glukocorticoide und IL-10 inhibieren die IL-6-Produktion [143, 144]. Der IL-6 Rezeptor (IL-6R) wird konstitutiv auf mononukleären Zellen, T- und B-Zellen und Hepatozyten exprimiert und interagiert mit dem Signal-Glykoprotein (gp)130 [145].

IL-6 wirkt wie ein endogenes Pyrogen und induziert (wie IL-1 β und TNF α) in den Hepatozyten die Produktion von Akut-Phase-Proteinen [146]. Darüber hinaus fördert IL-6 die Differenzierung von Nervenzellen, wirkt als Ko-Faktor für die terminale Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und unterstützt die Immunglobulin-Synthese. Außerdem verbessert IL-6 die Sensitivität von T-Zellen gegenüber IL-2 und induziert die Differenzierung von Makrophagen [147, 148]. Daneben zeigt IL-6 auch anti-inflammatorische Eigenschaften, da es die Synthese von IL-1 β und TNF α durch die Erhöhung der Serumkonzentration von IL-1ra und den löslichen TNF-RI inhibiert [149].

Für die Blockade von IL-6 wurde der Antikörper Tocilizumab zugelassen und zeigte Erfolge bei der Behandlung von Patienten mit RA (in Kombination mit MTX) [150]. Die Behandlung von Patienten mit axSpA mit Tocilizumab war wenig effektiv bei Patienten, die nicht auf eine Therapie mit anti-TNF α Inhibitoren ansprachen [151-153].

IL-10

Das unglykosylierte IL-10 (17-21 kD) zeigt sowohl immunsuppressive als auch immunmodulatorische Eigenschaften. Es wird vor allem von Typ-2-polarisierten T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen sezerniert [112, 154]. Der Rezeptor IL-10R wird auf Makrophagen, T-, B-, NK- und Mastzellen exprimiert. Die Induktion der IL-10-Synthese in Monozyten erfolgt durch bakterielle Endotoxine und wird durch IL-4 und IFN γ inhibiert [63]. Die biologische Aktivität von IL-10 umfasst sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Effekte. In Monozyten inhibiert IL-10 die Produktion von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF α und von IL-10 selbst und induziert die Expression von IFN γ und IL-1ra [154-158]. Darüber hinaus werden die Produktion von antimikrobiellen Effektor-Mechanismen (z.B. NO-Produktion), die Expression kostimulatorischer Moleküle (CD80/86) und die Antigenpräsentation durch IL-10 herab reguliert [154, 159, 160].

IL-10 hat nicht nur deaktivierende Effekte auf Monozyten, sondern induziert auch die Produktion antiinflammatorischer Zytokine und führt zur Reifung von Monozyten [161].

Das Ausmaß einer generierten Immunantwort wird durch IL-10 gehemmt und es ist wesentlich an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen dem Schutz vor Pathogenen und einer kontrollierten Gewebsschädigung beteiligt.

IL-10 stellt ein interessantes Zytokin für die Behandlung von inflammatorischen Krankheiten dar, da es die Fähigkeit besitzt TNF α und IL-1 β zu supprimieren und IFN γ zu induzieren.

3.3.2.2 Phagozytose

Unter Phagozytose versteht man die aktive Aufnahme und Beseitigung von eingedrungenen Partikeln oder Mikroorganismen und geschädigten oder gealterten (apoptotischen) Zellen. Im peripheren Blut sind Monozyten und Neutrophile Granulozyten zur Phagozytose befähigt [162]. Im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten sind Monozyten in der Lage, nach der Phagozytose und dem Abbau der fremden Proteine einzelne Peptide auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und so die Zellen des adaptiven Immunsystems zu aktivieren [162].

Für die Erkennung und Bindung bakterieller Komponenten besitzen Monozyten eine Reihe von Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Dazu zählen der LPS-Rezeptor CD14, die Fc γ -Rezeptoren CD16, CD32 und CD64 für die Antikörper-vermittelte Phagozytose, die Integrine CD11b/CD18 und CD11c/CD18, der Mannoserezeptor, der Scavenger-Rezeptor und die TLR [106, 163].

Während die Bindung und Phagozytose bakterieller Strukturen eine Entzündungsreaktion auslöst und zur Freisetzung von Zytokinen führt, hat die Phagozytose von apoptotischen Zellen eine anti-inflammatorische Wirkung [162, 164].

3.3.3 Phänotyp von humanen Monozyten

Monozyten bilden eine heterogene Gruppe. Anhand der Expression des LPS-Rezeptors CD14 und des Fc γ -Rezeptors CD16 können drei phänotypisch und funktionell verschiedene Populationen unterschieden werden. Die CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten werden als „klassische Monozyten“ bezeichnet und stellen mit ca. 80 - 90 % den Hauptanteil der Monozyten dar [108, 165, 166]. Die „intermediären Monozyten“ CD14⁺⁺CD16⁺ und die „nicht-klassischen Monozyten“ CD14⁺CD16⁺ tragen nur mit je 5 - 10% zum Monozytenpool bei [167]. Aufgrund einer höheren Expression des Humanen Leukozyten Antigens (HLA)-DR auf CD14⁺CD16⁺ Monozyten wird im Vergleich zu den klassischen Monozyten eine verstärkte Antigenpräsentation dieser Zellen angenommen [168].

CD16 exprimierende Monozyten stellen eine wichtige Quelle pro-inflammatorischer Zytokine dar [169, 170] und können bei entzündlichen und nicht-entzündlichen Erkrankungen stark ansteigen [171-173]. Als Antwort auf eine LPS-Stimulation *in vitro* produzierten die CD14⁺CD16⁺ Monozyten mehr TNF- α und die CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten mehr IL-10 im Vergleich zu den anderen Subpopulationen [174].

Alle Monozyten exprimieren CD115, den *Macrophage Colony Stimulating Factor* (M-CSF)-Rezeptor. M-CSF ist ein Wachstumsfaktor, der für die Entwicklung von naiven Monozyten aus den myeloiden Vorläuferzellen, ihr Überleben sowie ihre Proliferation und Differenzierung zu Makrophagen und Osteoklasten essenziell ist [110, 175].

CD68 ist ein lysosomal assoziiertes Glykoprotein und kann intrazellulär bei Monozyten, Makrophagen und plasmazytoiden Dendritischen Zellen nachgewiesen werden [6, 176, 177]. Die Funktion von CD68 ist weitgehend unbekannt. Die Lokalisation im späten Endosom könnte auf eine Rolle bei der Antigenprozessierung hinweisen. Auf Makrophagen kann CD68 teilweise auch auf der Oberfläche nachgewiesen werden und agiert dort als Scavenger Rezeptor für die Internalisierung von oxLDL [178].

CD163 ist der „*Hemoglobin Scavenger*“-Rezeptor und vermittelt die Endozytose von Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexen. Damit wird der Organismus vor Hämoglobin-induzierten oxidativen Gewebeschäden nach einer Hämolyse geschützt [179]. CD163 hat anti-inflammatorische und atheroprotektive Eigenschaften. Bisher ist kein Ligand-Rezeptor-Effektor-Mechanismus bekannt [179].

Die co-stimulatorischen Moleküle CD80/86 werden konstitutiv auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), wie Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und Dendritischen Zellen exprimiert [180]. Für die vollständige Aktivierung von T-Zellen ist eine Interaktion zwischen den co-stimulatorischen Molekülen CD80/86 auf den APZ und dem co-stimulatorischen Molekül CD28 auf den T-Zellen notwendig. Die Bindung von CD80/86 an das induzierbare *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen* (CTLA)-4 führt zur Terminierung der T-Zellantwort [181]. Neben dem Zell-Zell-Kontakt können pro-inflammatorische Zytokine zur Hochregulation von co-stimulatorischen Molekülen führen und so zu einer verstärkten T-Zellaktivierung beitragen [182].

3.4 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde teilweise im Rahmen des vom Bundes-Ministeriums für Bildung und Forschung (BMBF)-geförderten Verbund-Projektes „Arthromark: Biomarker und Bildgebung zur Diagnose und Stratifizierung der Rheumatoiden Arthritis und Spondyloarthritis“ durchgeführt. Das Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung potenzieller Biomarker bei Patienten mit axSpA und die Überprüfung des diagnostischen oder prognostischen Potenzials für die Anwendung in der klinischen Praxis.

Die axiale Spondyloarthritis (axSpA) ist eine chronische entzündlich-rheumatische Erkrankung. Sie ist stark mit dem Vorhandensein von HLA-B27 assoziiert. Die Erkrankung ist durch Entzündungen in den Sakroiliakalgelenken (SIG) und den Wirbelkörpern vorwiegend der Lendenwirbelsäule charakterisiert, was zum typischen klinischen Symptom Rückenschmerz führt. Da Rückenschmerz ein ausgesprochen häufig auftretendes Symptom darstellt, ist es schwierig, die Patienten mit axSpA aus der großen Gruppe von Patienten mit dem Symptom Rückenschmerz zu identifizieren. Das beruht auch darauf, dass sich röntgenlogische Veränderungen häufig erst nach langem Krankheitsverlauf entwickeln und es derzeit wenig serologische Marker gibt, die zur Diagnosestellung herangezogen werden können. Darüber hinaus kann der Krankheitsverlauf stark variieren. Ein Teil der Patienten entwickelt im Verlauf der Erkrankung Gelenkankylosen und Syndesmophyten, d.h. Knochenbrücken zwischen Wirbelkörpern. Diese knöchernen strukturellen Gelenkveränderungen beeinträchtigen die Gelenkfunktion und tragen neben der Schmerz- und Entzündungssymptomatik wesentlich zur Beeinträchtigung der Lebensqualität der axSpA-Patienten bei.

Ziel dieser Arbeit war es Biomarker im Blut zu identifizieren, die zur Diagnosestellung und/oder zur Prognosebestimmung bei Patienten mit axSpA genutzt werden können. Es sollten daher die Serumkonzentrationen von Proteinen bestimmt werden, die mit Entzündung oder dem Knorpel- und Knochenmetabolismus assoziiert sind. Die diagnostische Kapazität sollte im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ohne Gelenkerkrankungen überprüft werden, während die prognostische Kapazität durch Vergleich der Serumkonzentrationen in Patienten mit und ohne Progression von strukturellen Veränderungen in der Wirbelsäule bestimmt werden sollte.

Die identifizierten Biomarker sollen helfen die Diagnosestellung zu erleichtern und zu beschleunigen und andererseits Patienten risikoadaptiert behandeln zu können.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Patienten und Kontrollen

Für die vorliegende Arbeit standen 207 Serumproben von Patienten aus der *German Spondyloarthritis Inception Cohorte* (GESPIC) zur Analyse von löslichen Biomarkern zur Verfügung. In diese Kohorte wurden Patienten mit diagnostizierter axialer Spondyloarthritis eingeschlossen [1]. Erfüllten die Patienten die modifizierten New York Kriterien wurden sie dann als AS-Patienten klassifiziert. Bei Nichterfüllen des röntgenologischen Kriteriums, d.h. eine Sakroilitis beidseitig Grad 2 oder einseitig Grad 3 - 4, mussten die Patienten bei Einschluss die ESSG Kriterien mit einigen Änderungen (zusätzliche Kriterien waren HLA-B27⁺, Uveitis und Daktylitis) erfüllen. Ein weiteres Einschlusskriterium war eine Symptombdauer von maximal 10 Jahren für AS-Patienten und 5 Jahren für Patienten mit nicht-röntgenologischer SpA (nrSpA). Ziel der Kohorte war es, die klinischen Parameter und den Krankheitsverlauf von nrSpA-Patienten im Vergleich zu AS-Patienten zu verfolgen. Die Studie wurde im Jahre 2000 initiiert und bei einigen Patienten wurden die klinischen Parameter und der Krankheitsverlauf mehr als 10 Jahre verfolgt [1, 20].

Für die Biomarker-Analysen wurde Material von den Patienten zum Zeitpunkt des Studieneintritts verwendet. Die weiteren Studienvisiten erfolgten halbjährlich. Zu allen Zeitpunkten wurde den Patienten jeweils 6-8 ml Vollblut in Vacutainer-Serumröhrchen mit Trenngel und Gerinnungsaktivator abgenommen. Die Röhrchen wurden für 20 min bei 20° C, (2000 rpm) zentrifugiert, um die Zellen vom Serum zu trennen. Das Serum oberhalb des Trenngels wurde abgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden bei -20° C bis zur Analyse gelagert.

Zusätzlich wurden klinische Parameter wie die Krankheitsaktivität, eventuelle Komorbiditäten, der Funktionsindex und die aktuelle Therapie erhoben. Die CRP-Konzentration im Serum und die BSG wurden im Diagnostik-Labor bestimmt. Von allen Patienten wurden Röntgenbilder der SIG und der Wirbelsäule zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses (Baseline) und nach 2 Jahren aufgenommen.

Für die Analyse der zellulären Biomarker wurden 34 Patienten der rheumatologischen Ambulanz rekrutiert, die als axiale SpA-Patienten diagnostiziert wurden. Auf Grundlage

vorhandener Röntgenbilder wurde auch hier zwischen Patienten mit AS und nr-SpA Patienten unterschieden. Patienten mit ReA, PsA oder Morbus Crohn/ Colitis Ulcerosa wurden von den Analysen ausgeschlossen. Von jedem Patienten wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme die Krankheitsaktivität erhoben und die CRP-Werte im Diagnostik-Labor bestimmt. Den Patienten wurden je 20 ml Vollblut entnommen, das innerhalb von 24 Stunden verarbeitet wurde. Auf Grundlage der aktuellen Therapie wurden die Patienten in Patienten mit Standard-Therapie (NSAR-Einnahme) und in Patienten mit biologischer Therapie (anti-TNF- α Applikation) unterteilt. Die angewendeten Biologika sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht der angewendeten Biologika bei Patienten mit axSpA

Handelsname	Wirkstoff	Art des Antikörpers
Humira®	Adalimumab	Humaner monoklonaler Antikörper gegen TNF-α
Enbrel®	Etanercept	Lösliches humanes TNF -Rezeptor Fusionsprotein
Remicade®	Infliximab	Chimärer monoklonaler Human/Maus Antikörper gegen TNF-α
Simponi®	Golimumab	Humaner monoklonaler Antikörper gegen TNF-α
Cimzia®	Certolizumab	Humanisiertes Fab Fragment + PEG (Polyethylenglykol) gegen TNF-α

Alle Patienten wurden vor der Probenentnahme über die Studie aufgeklärt und haben der Blutentnahme und der Verarbeitung sowohl des Probenmaterials als auch der klinischen Daten durch Unterzeichnung einer Einverständniserklärung zugestimmt.

Des Weiteren wurden 30 Serumproben von gesunden Kontrollen ohne muskuloskeletale Vorerkrankungen für die Analyse der löslichen Biomarker und 24 Vollblutproben für die Analyse der zellulären Biomarker verwendet.

4.1.2 Bewertung der Krankheitsaktivität

Die Krankheitsaktivität bei der axSpA wird anhand eines Fragebogens erfasst und durch den *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index* (BASDAI) ausgedrückt.

Der Fragebogen besteht aus sechs Punkten zu Dauer und Intensität von Müdigkeit, Schmerzen und Morgensteifigkeit der letzten sieben Tage, die der Patient auf einer Skala von 0 (keine Beschwerden) bis 10 (unerträgliche Beschwerden) bewertet. Der BASDAI ergibt sich aus dem Mittelwert der Antworten (Abb. 8). Es handelt sich hierbei also um eine subjektive Einschätzung der Krankheitsschwere durch den Patienten.

In der Praxis wird der BASDAI für die Bewertung der Wirksamkeit einer Therapie herangezogen. Ab einem BASDAI von 4 ist von einer erhöhten Krankheitsaktivität auszugehen.

Wie ist es Ihnen in den letzten 7 Tagen ergangen?

Bitte kreuzen Sie auf den nachfolgenden Skalen jeweils eine Zahl an. Auch wenn die Beschwerden (Schmerzen, Müdigkeit) geschwankt haben, entscheiden Sie sich **bitte für eine Zahl** als Angabe für die durchschnittliche Stärke der Beschwerden.

1. Wie würden Sie Ihre allgemeine Müdigkeit und Erschöpfung beschreiben?

keine Müdigkeit/ Erschöpfung ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 sehr starke Müdigk./Ersch.

2. Wie stark waren Ihre Schmerzen in Nacken, Rücken oder Hüfte?

keine Schmerzen ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 sehr starke Schmerzen

3. Wie stark waren Ihre Schmerzen oder Schwellungen in anderen Gelenken?

keine Schmerzen ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 sehr starke Schmerzen

4. Wie unangenehm waren für Sie besonders berührungs- oder druckempfindliche Körperstellen?

gar nicht ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 sehr stark

5. Wie ausgeprägt war Ihre Morgensteifigkeit nach dem Aufwachen?

gar nicht ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐ 6 ☐ 7 ☐ 8 ☐ 9 ☐ 10 sehr stark

6. Wie lange dauert diese Morgensteifigkeit im allgemeinen?

in Stunden ☐ 0 ☐ ¼ ☐ ½ ☐ ¾ ☐ 1 ☐ 1¼ ☐ 1½ ☐ 1¾ ☐ ≥2
hatte keine

BASDAI-Score:

Berechnung: 1. Umrechnung der Zeitangabe von Frage 6 in eine Skalierung von 0-10: Bsp: 1/4 Std=1,25; 1/2 Std=2,5; 3/4= 3,75; 1 Std=5 usw.; 2. Bildung eines Gesamtmittelwertes aus Frage 1-4 und dem Mittel aus Fragen 5 und 6 zur Morgensteifigkeit ergeben den BASDAI-Score

Abbildung 8: Fragebogen zur Ermittlung des BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index)

4.1.3 Bewertung der Funktionalität

Der *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index* (BASFI) dient der Bewertung von Funktionseinschränkungen der Beweglichkeit. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen Fragebogen, der von dem Patienten ausgefüllt wird. Die Fragen beziehen sich auf körperliche Einschränkungen des Patienten bei der Verrichtung alltäglicher Aufgaben, wie ein Objekt vom Fußboden aufzuheben oder sich allein anzukleiden. Die Skala reicht auch hier von 0 bis 10 und der Index ergibt sich aus dem Mittelwert. Der BASFI wird für die Beurteilung des Einflusses therapeutischer Maßnahmen auf die Funktionalität angewandt.

4.1.4 Bestimmung der röntgenologischen Progression in der Wirbelsäule

Die röntgenologische Progression wurde durch die verblindete Bewertung (Scoring) der Röntgenaufnahmen der Patienten zu Baseline (Zeitpunkt des Studieneintritts) und nach 2 Jahren bestimmt. Dazu wurden die Röntgenaufnahmen digitalisiert und sowohl hinsichtlich der Identität des Patienten als auch des Aufnahmezeitpunktes verblindet und durch zwei Rheumatologen (HH, DP) bewertet. Die strukturellen Veränderungen im Bereich der Hals- und Lendenwirbelsäule wurden durch die Bewertung der lateralen (seitlichen) Aufnahmen mit dem mSASSS quantifiziert (siehe 3.1.3). Zusätzlich wurde eine Neubildung bzw. das Wachstum von Syndesmophyten durch die Bewertung der lateralen Aufnahmen in Verbindung mit Aufnahmen in Vorderansicht (anterior-posterior) bestimmt.

Als röntgenologische Progression wurde ein mSASSS Anstieg von mindestens 2 Punkten oder die Neubildung bzw. das Wachstum von schon vorhandenen Syndesmophyten mit dem Ergebnis einer knöchernen Überbrückung zwischen zwei Wirbelkörpern innerhalb von 2 Jahren festgelegt.

4.1.5 Technische Geräte

Brutschrank BB15 function line	Heraeus, Hanau, Deutschland
Eismaschine	IPX-3, Maitowoc, Italien
ELISA-Reader Magellan6	Tecan, Crailsheim, Deutschland
FACS Calibur	Becton Dickinson (BD), Heidelberg, Deutschland
Gefrierschränke -20° C, -80° C	ThermoScientific u. Herasafe, Deutschland
Kühlschrank	Bosch, Berlin, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte	Heidolph MR3001, Schwabach, Deutschland
Mini-Schüttler	IKA MS1, Wilmington, NC, USA
Schüttelgerät	Asisstent 348/1, Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Signaluhren	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sonicator	Sonotex TK52H, Bandelin, Berlin, Deutschland
Sterilbank	Herasafe, Heraeus, Hanau, Deutschland
Waage	Scout Pro SPU 202, Ohaus Corporation, NJ, USA
Wärme- / Trockenschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad	Julabo TW8, Seelbach, Deutschland
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R, Megafuge 1.0, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland

4.1.6 Verbrauchsmaterialien

Einwegpipetten	5, 10 und 25 ml, BD, Heidelberg, Deutschland
Einfrierröhrchen	1,8 ml Thermo Fisher Scientific, USA
FACS Röhrchen	BD, Heidelberg, Deutschland
Glaskolben	2000 ml, Schott Duran, Deutschland
Glaszylinder	1000 ml, Brand Eterna Duran, Deutschland
Gewindeflaschen	1000 ml, VWR, Darmstadt, Deutschland
Handschuhe	Gr. S powderfree, Emerson, Italien
Konische Röhrchen	15 ml, 50 ml, BD, Heidelberg, Deutschland
Leucosep-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Multi-Kanal-Pipette	300 µl, eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multi-Kanal-Pipetten Reservoir	Trifill, Camlab, Cambridge, England

Multipette® Plus	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Papiertücher	Tork, Telgte, Deutschland
Pipetten	1, 100 und 1000 µl, BD, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäßständer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße	1500 µl, 500 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vacutainer-Röhrchen	heparinbeschichtet, 10 ml, BD, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten	96-Lochplatte, NUNC, Dänemark

4.1.7 Chemikalien

<i>Aqua dest</i>	Ampuwa, Fresenius, Deutschland
Beriglobin	Sigma, Deutschland
Brefeldin A	Sigma, Deutschland
BSA	Sigma, Deutschland
EDTA	Sigma, Deutschland
Erythrozyten-Lysepuffer	Quiagen, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>FACS Clean</i>	BD, Heidelberg, Deutschland
<i>FACS Flow</i>	BD, Heidelberg, Deutschland
<i>FACS Rinse</i>	BD, Heidelberg, Deutschland
<i>FACS-Lysing solution</i>	BD, Heidelberg, Deutschland
Formalinlösung (Formaldehyd)	J. T. Baker, Niederlande
NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS	Gibco, Lifetechnologies Pasching, Österreich
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Saponin	Sigma, Deutschland

4.1.8 Verbrauchsmittel

4.1.8.1 Puffer

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Erythrozyten Lysepuffer	20 mM KHCO ₃ ; 310 mM NH ₄ Cl; 1 mM EDTA ; aqua dest.
PBA (PBS + BSA + NaN ₃)	90 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,5 % (w/v) BSA; 0,02 % (v/v) NaN ₃
PBS/ BSA	90 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,5 % (w/v) BSA
PBS, pH 7,6	90 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH ₂ PO ₄

4.1.8.2 Kommerzielle Komplettsysteme

Tabelle 3: Kommerzielle Komplettsysteme

Bezeichnung	Hersteller
pHrodo <i>e.coli</i> BioParticles Phagocytosis Kit for Flow Cytometry	Invitrogen, Paisley, UK
Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit	Thermo Scientific, Rockford, US
IL-6 ELISA	R & D Systems, Abingdon, UK
IL-10 ELISA	BD OptEIA™, Heidelberg, D
IL-22 ELISA	R & D Systems, Abingdon, UK
BMP-2 ELISA	Boster Immunoleader, Pleasanton, US
BMP-7 ELISA	R & D Systems, Abingdon, UK
BAP EIA Kit MicroVue	Quidel Corporation, San Diego, US
CTX-II ELISA	USCN, Wuhan, CN
LBP ELISA	USCN, Wuhan, CN
MMP-3 ELISA	Ray Biotech®, Norcross, US
NTX-I Osteomark® ELISA	Whampole, Princeton, US
OPG ELISA	Biomedica, Wien, A
PINP ELISA	USCN, Wuhan, CN
PIINP ELISA	USCN, Wuhan, CN
sCD14 ELISA	R & D Systems, Abingdon, UK
Ampli sRANKL ELISA	Biomedica, Wien, A
VEGF ELISA	R & D Systems, Abingdon, UK

4.1.8.3 Zellstimulanzen

Tabelle 4: Zellstimulanzen

Stimulus		Hersteller		
LPS	Lipopolysaccharid (e.coli: O111:B4)	Sigma	Missouri	US
FSL	Fibroblasten stimulierendes Lipopeptid	EMC	Tübingen	D
MDP	Muramyl dipeptid	InvivoGen	San Diego	US
PAM ₃ CSK ₄	tripalmitoyliertes Lipoprotein	EMC	Tübingen	D

4.1.8.4 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie

Spezifität	Isotyp	Konjugation	Verdünnung	Klon	Herkunft	Hersteller
CD14	IgG2a	PerCPcy5.5	1:25	M5E3	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD14	IgG1	APC	1:10	B73.1	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD16	IgG1	APC	1:50	B73.1	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD64	IgG1	PE	1:10	10.1	Maus	Dako, Glostrup; DK
CD68	IgG2b	PerCPcy5.5	1:50	Y1/82A	Maus	Biolegend, San Diego, US
CD80	IgG1	PE	1:10	2D10	Maus	Biolegend, San Diego, US
CD115	IgG1	PE	1:5	12-3A3-1B10	Ratte	e-bioscience, Frankfurt, DE
CD163	IgG1	PE	1:2,5	GHI/61	Maus	BD, Heidelberg, DE
CD281	IgG1	PE	1:50	GD2.F4	Maus	e-bioscience, Frankfurt, DE
CD282	IgG2a	PE	1:50	TL2.1	Maus	e-bioscience, Frankfurt, DE
CD284	IgG2a	PE	1:50	HTA125	Maus	e-bioscience, Frankfurt, DE
HLA-DR	IgG1	FITC	1:50	L243 (G46-6)	Maus	BD, Heidelberg, DE
IL-1β	IgG1	Alexa Fluor 647	1:10	JK 1B-1	Maus	Biolegend, San Diego, US
IL-1ra	IgG1	PE	1:10	AS17	Maus	BD, Heidelberg, DE
IL-10	IgG2a	APC	1:100	JES-19F1	Ratte	BD, Heidelberg, DE
IL-6	IgG1	FITC	1:10	MQ2-13A5	Ratte	BD, Heidelberg, DE
p40 (IL12/23)	IgG1	PE	1:10	ebioHP40	Maus	e-bioscience, Frankfurt, DE
TNF-α	IgG1	FITC	1:200	Mab11	Maus	BD, Heidelberg, DE

4.2 Methoden

4.2.1 Quantifizierung löslicher Proteine

Mit Hilfe der *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay* (ELISA) Technik können lösliche Proteine in verschiedenen Körperflüssigkeiten quantitativ analysiert werden. Die Methode basiert bei den meisten kommerziellen ELISA-Kits auf dem Sandwichprinzip. Dabei ist die ELISA-Platte mit einem spezifischen Antikörper gegen das zu detektierende Protein beschichtet. Durch Zugabe der Probe bindet das Ziel-Protein an diesen Antikörper (Abb. 9A). Im nächsten Schritt wird das gebundene Protein durch einen zweiten Antikörper gebunden, der ein anderes Epitop des gleichen Proteins erkennt (Abb 9B). Dieser Antikörper ist entweder direkt mit einem Enzym gekoppelt oder mit Biotin, an das ein Streptavidin-Enzym-Komplex bindet (Abb 9C). Das Enzym katalysiert die Farbreaktion des Substrates. Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin und kann so die Farbreaktion des Substrates um ein Vielfaches erhöhen (Abb 9D). In einem letzten Schritt wird die Farbreaktion durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet.

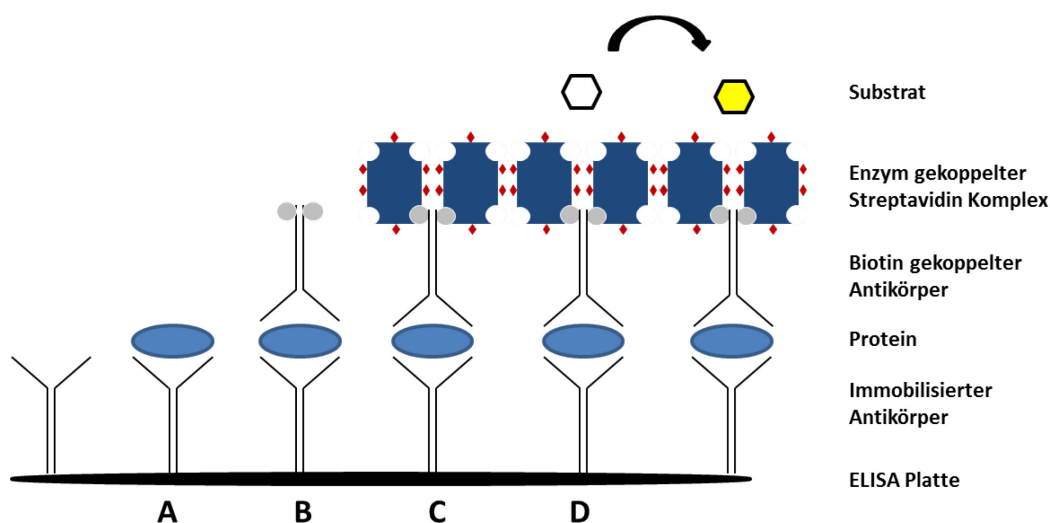


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Sandwich-ELISA Technik

Die Farbintensität ist dabei proportional zur Proteinkonzentration in der Probe. Anhand einer Standardverdünnungsreihe wird die Konzentration in der Probe berechnet.

Eine andere Variante stellt der kompetitive ELISA dar. Hier werden synthetische Proteine, die dem nachzuweisenden Protein strukturell ähnlich sind, an die ELISA Platte gebunden (Abb 10A). Nach Zugabe der Probe und des enzymkonjugierten Antikörpers konkurrieren

(konkurrieren) das Festphasenprotein und das lösliche Protein aus der Probe um die Bindung am Antikörper (Abb 10B). Je höher die Konzentration des Proteins in der Probe ist, desto stärker wird die Bindung des Detektions-Antikörpers an das Festphasenprotein verhindert. Nach Zugabe des Substrates katalysiert das Enzym die Farbreaktion (Abb 10C), die durch Zugabe der Stopp-Lösung beendet wird.

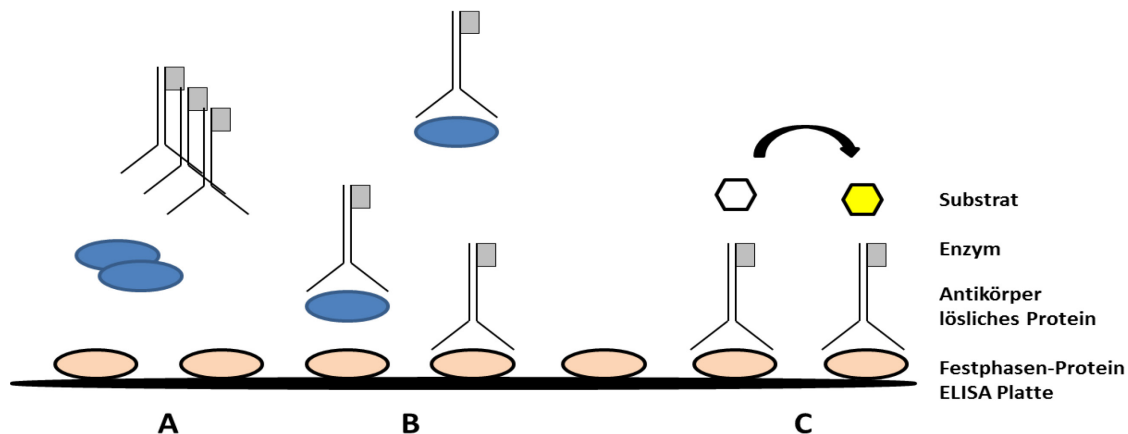


Abbildung 10: Schematische Darstellung der kompetitiven ELISA Technik

Anders als beim Sandwich-ELISA ist hier die Konzentration des löslichen Proteins in der Probe indirekt proportional zur Farbtintensität.

4.2.2 Nachweis von IL-10 in Stimations-Überständen

Der Nachweis von IL-10 erfolgte mittels Sandwich-ELISA (BD). Die bei -20° C gelagerten Überstände der Stimationsansätze von Kontrollen und Patienten wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Für den IL-10 Nachweis wurden die Überstände der unstimulierten Ansätze unverdünnt und der stimulierten Ansätzen 1:2 mit *ELISA-diluent* verdünnt verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Hersteller-Protokoll und die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm am *ELISA Reader* gemessen.

4.2.3 Nachweis von Markern des Knorpel- und Knochenmetabolismus und Entzündungsmarkern (Biomarkeranalyse) in humanem Blutserum

Für die Quantifizierung von Proteinen mittels ELISA wurden die bei -20° C gelagerten Serumproben bei RT aufgetaut. Jeder ELISA wurde etabliert, indem eine Serum-

Verdünnungsreihe angefertigt wurde, um die optimale Verdünnung für den Nachweis des entsprechenden Proteins festzulegen. In Tabelle 6 sind die Verdünnungsfaktoren, Inkubations-Zeiten und -Temperaturen für jeden ELISA zusammen gefasst.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten ELISA

Jeder ELISA wurde vor der serienmäßigen Verwendung etabliert. Dazu wurden die optimalen Verdünnungsfaktoren der Serumproben, Inkubationszeiten und –temperaturen bestimmt. Zusätzlich sind die Detektionsantikörper, die Konjugate, die Verstärkersysteme und Enzyme, die Substrate und die benutzten Wellenlängen für die Messung der Extinktion dargestellt.

ELISA	Serum VF	1. Inkubation		Detektions-Antikörper und Konjugat	2. Inkubation		Verstärker und Enzym	3. Inkubation		Substrat	Extinktion (nm)
		t in min	T in °C		t in min	T in °C		t in min	T in °C		
BALP	1:2	180	RT	-	-	-	-	-	-	pNPP	490
BMP-2	1:20	90	37	Biotin-anti-human BMP-2	60	37	Avidin-Biotin-HRP	30	37	TMB	450
BMP-7	unv.	120	RT	HRP-anti-human BMP-7	120	RT	-	-	-	TMB	405
CTX-II	1:40	120	37	Biotin-anti-human CTX-II	60	37	Streptavidin-HRP	30	37	TMB	450
IL-6	unv.	120	RT	HRP-anti-human IL-6	120	RT	-	-	-	TMB	450
LBP	1:500	120	37	Biotin-anti-human LBP	60	37	Avidin-HRP	30	37	TMB	450
MMP-3	1:10	150	RT	Biotin-anti-human MMP-3	60	RT	Streptavidin-HRP	45	RT	TMB	450
NTX-1	1:5	-	-	HRP-anti-human NTX-I	90	RT	-	-	-	TMB	450
OPG	1:10	-	-	Biotin-anti-human OPG	ün	4	Streptavidin-HRP	60	RT	TMB	450
PIINP	1:40	120	37	Biotin-anti-human PIINP	60	37	Avidin-HRP	30	37	TMB	450
PINP	1:40	120	37	Biotin-anti-human PINP	60	37	Avidin-HRP	30	37	TMB	450
sCD14	1:500	180	RT	HRP-anti-human sCD14	60	RT	-	-	-	TMB	450
sRANKL	1:2	-	-	Biotin-anti-human sRANKL	ün	4	Streptavidin-AP	60	RT	TZV	450
VEGF	unv.	120	RT	HRP-anti-human VEGF	120	RT	-	-	-	TMB	450

AP - alkalische Phosphatase; HRP - horse radish peroxidase; pNPP - para Nitrophenylphosphat; RT - Raumtemperatur; TMB - Tetramethylbenzidin; TZV - Tetrazoliumviolett; ün - über Nacht; unv. - unverdünnt; VF - Verdünnungsfaktor

Bei allen ELISA's wurde die Farbreaktion durch die Zugabe von Schwefelsäure gestoppt; nur bei BALP wurde die Base NaOH zum Abstoppen verwendet.

4.2.4 Nachweis von Endotoxinen in humanem Blutserum

LPS ist ein integraler Bestandteil der Zellmembran gram-negativer Bakterien und wird in freier Form als Endotoxin bezeichnet. Mit der chromogenen Limulus Amöbozyten (LAL)-Endpunktmethod wurde LPS in humanen Serumproben nachgewiesen und quantifiziert. Grundlage dieses Tests bildet ein Lysat aus Blutzellen (Amöbozyten) des amerikanischen Pfeilschwanzkrebsses (*Limulus polyphemus*). Dieses Lysat (LAL) enthält ein Proenzym, das durch freies bakterielles LPS aktiviert wird. Für die Quantifizierung des Endotoxingehaltes wird der Probe ein chromogenes Substrat zugesetzt, welches das farblose para-Nitroanilin (pNA) enthält. Die Abspaltung von pNA vom Substrat durch das aktivierte Enzym führt zu einer Farbentwicklung. Die Umsetzung des chromogenen Substrats führt zu einer Änderung der Extinktion, die photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm quantifiziert werden kann. Der Endotoxingehalt in den Proben wurde auf einen Kontrollstandard bekannter

Konzentration bezogen. Das lyophilisierte *Escherichia (E)-coli* Control-Standard-Endotoxin enthielt laut Zertifikat des Herstellers 28 Endotoxin-Einheiten (*Endotoxinunits* - EU) und wurde durch Zugabe von endotoxinfreiem Wasser (EFW) auf eine Konzentration von 1 EU/ml verdünnt. Der Standard wurde in vier Stufen mit dem Faktor zwei verdünnt und als Nullstandard wurde EFW verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Serumproben von Patienten und Kontrollen aufgetaut und mit EFW 1:2 verdünnt. Um eventuell vorhandene Inhibitoren zu inaktivieren, wurden die Proben im Wasserbad für 15 min auf 70° C erhitzt. 50 µl jeder Probe wurden in eine auf 37° C warme 96-Loch Zellkulturplatte überführt und für 5 min bei 37° C inkubiert. Das lyophilisierte LAL-Reagenz wurde in 1,4 ml EFW gelöst. Davon wurden 50 µl in jede Vertiefung der Zellkulturplatte pipettiert. Die Proben wurden für 10 min bei 37° C im Brutschrank inkubiert, damit die erste Reaktion, die Spaltung des Proenzym durch LPS, erfolgen konnte. Danach wurden 7 mg des lyophilisierten chromogenen Substrats in 6,5 ml EFW gelöst, davon je 100 µl in jede Vertiefung der Zellkulturplatte gegeben und die Proben für weitere 6 min bei 37° C inkubiert. In diesem Zeitraum fand die zweite Reaktion statt, die zur Abspaltung von p-NA vom Substrat durch das aktivierte Enzym führte. Um die Reaktion zu beenden, wurden nach der Farbentwicklung 50 µl einer 20 %igen Essigsäure in jede Vertiefung der Zellkulturplatte gegeben. Die Messung der Absorption wurde an einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm vorgenommen. Die Farbentwicklung ist direkt proportional zur Endotoxin-Konzentration im Serum. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 0,05 EU/ml.

4.2.5 Analytische Durchflusszytometrie

Bei der analytischen Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Messverfahren zur fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (*FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting*). Neben morphologischen Eigenschaften der Zellen und der Expression von Oberflächenmolekülen, kann auch die Synthese verschiedener intrazellulärer Proteine (z.B. Zytokine) analysiert werden. Die Durchflusszytometrie liefert hierbei sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage zur Expression des jeweiligen Proteins auf Zellebene.

Ein System aus Druckluft und Trägerflüssigkeit gewährleistet den Probenfluss durch das Zytometer. Die Suspensionszellen werden in einem Flüssigkeitsstrahl zum Messpunkt transportiert, an dem der Laser auf die Zelle trifft. Pro Zeiteinheit passiert nur eine Zelle den

Laserstrahl. Das Licht wird von den Zellen gebeugt, ohne dabei die Wellenlänge zu verändern und dann von Detektoren aufgefangen. Der Vorwärtstreulicht (*Forward Scatter FSC*)-Detektor erfasst die Größe der Zelle, während der sich im 90° - Winkel zum einfallenden Laserlicht befindliche Seitwärtstreulicht (*Sideward Scatter SSC*)-Detektor das durch die Granularität der Zelle gestreute Licht misst. Bereits durch die Auftragung von SSC gegen FSC ist es möglich, die Zelltypen einer heterogenen Zellpopulation zu unterscheiden (Abb. 11).

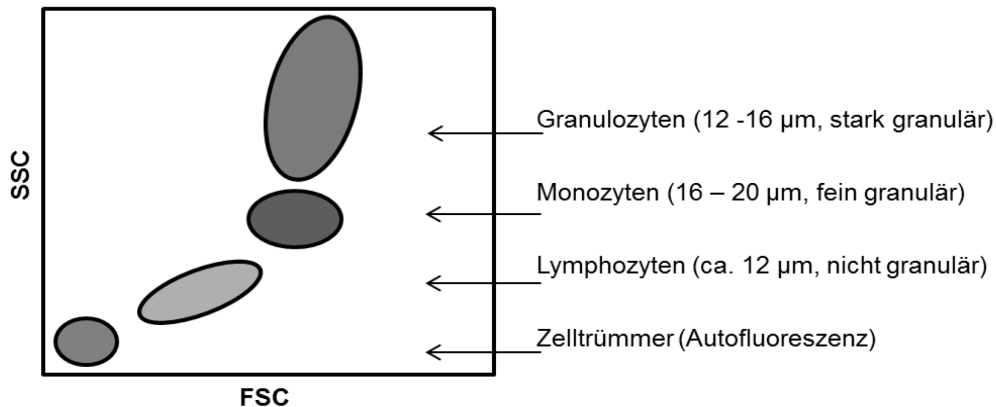


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Zellpopulation im FSC/SSC Dot-Plot (Durchflusszytometrie)

Die Klassifizierung weiterer Untergruppen erfolgt durch die Analyse der Expression bestimmter zellulärer Parameter wie Oberflächenantigene oder intrazelluläre Proteine. Diese Immunphänotypisierung findet mit Hilfe der Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern an spezifische *Cluster of Differentiation* (CD)-Antigene statt. Die Fluorochrome absorbieren das Licht einer bestimmten Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch Teilerspiegel und verschiedene Filter (Lang-, Kurz- und Bandpassfilter) in Fluoreszenzspektren aufgetrennt und gelangt dann auf photosensitive Detektoren (Photomultiplier). Das optische Signal wird zunächst in elektrische Ströme und dann in ein digitales Signal umgewandelt. Durch Verwendung von mehreren Lasern und Detektoren können bis zu 12 Parameter gleichzeitig erfasst werden.

Für die vorliegende Arbeit erfolgten die Messungen am FACS Calibur. Im verwendeten Analysegerät standen zwei Laser (Argon und Diodenlaser) mit vier Detektionskanälen [530 nm (Fluoreszenzkanal FL1), 585 nm (FL2), 650 nm (FL3) und 670 nm (FL4)] zur Verfügung. Fluoreszenzfarbstoffe zeichnen sich jeweils durch ein charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum aus. In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe zusammengefasst.

Tabelle 7: Übersicht der Fluorochrome der verwendeten Antikörper

Fluorochrom	Absorptions-Maximum [nm]	Emissions-Maximum [nm]
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	495	520
R-Phycoerythrin (PE)	480, 565	575
Allophycocyanin (APC); Alexa 647	650	660
Peridinium Chlorophyll Protein + Sulfoindocyanin 5.5 (PerCp Cy5.5)	482	695

Die Auswertungen der Daten wurde mit der *FlowJo Software* durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden als zweidimensionale Punktdiagramme (*Dot Plots*) oder als eindimensionale Histogramme (*Histogram-Plots*) dargestellt. Die FSC- und SSC-Signale wurden linear, alle anderen Fluoreszenzsignale in logarithmischer Form dargestellt.

4.2.6 Phänotypische Analyse von Monozyten aus humanem Vollblut

Für die phänotypische Analyse wurde die Expression von Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie näher charakterisiert. Dazu wurden 2 ml frisches heparinisiertes Vollblut mit 8 ml Lysepuffer (Qiagen) für 15 min auf Eis inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren, ohne jedoch die Zellen zu fixieren. Nach dem Zentrifugieren für 10 min bei 4° C (1500 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml PBA resuspendiert und auf 4 Reaktionsgefäße aufgeteilt. Jedes Zellpellet wurde nach einem weiteren Zentrifugations-Schritt in 50 µl einer Antikörperlösung resuspendiert und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert (Tab. 8).

Tabelle 8: Zusammenfassung der verwendeten Antikörperlösungen für die phänotypische Charakterisierung der Monozyten im Vollblut (Färbung 1 -4)

Antikörper (Färbung 1)	Verdünnung
CD14 PerCP-cy5.5	1:25
HLA-DR FITC	1:10
CD163 PE	1:2,5
CD16 APC	1:50

Antikörper (Färbung 2)	Verdünnung
CD14 PerCP-cy5.5	1:25
HLA-DR FITC	1:10
CD80 PE	1:10
CD16 APC	1:50

Antikörper (Färbung 3)	Verdünnung
CD14 PerCP-cy5.5	1:25
HLA-DR FITC	1:10
CD115 PE	1:5
CD16 APC	1:50

Antikörper (Färbung 4)	Verdünnung
CD14 PerCP-cy5.5	1:25
HLA-DR FITC	1:10
CD64 PE	1:10
CD16 APC	1:50

Jeder Antikörperlösung wurde Beriglobin (1:50) hinzugefügt, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nicht gebundene Antikörper wurden durch einen weiteren Waschschrift entfernt. Dazu wurde je 1 ml PBA zu jedem Färbeansatz dazugegeben, für 10 min bei 4° C (1500 rpm) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 300 µl PBA aufgenommen und sofort durchflusszytometrisch analysiert.

Die Expression von TLR-1 (CD281), TLR-2 (CD282) und TLR-4 (CD284) auf der Oberfläche von Monozyten wurde im Vollblut analysiert. Dazu wurden je 50 µl Vollblut direkt mit Antikörpern gegen CD14 (PerCP-Cy 5.5; 1:25), HLA-DR (FITC; 1:10), CD16 (APC; 1:50) und je ein Ansatz CD281 (PE; 1:10); CD282 (PE; 1:10) und CD284 (PE; 1:10) in Anwesenheit von Beriglobin (1:50) für 15 min bei RT gefärbt. Die Erythrozyten wurden im Anschluss durch Zugabe von 450 µl Lysepuffer lysiert und anfixiert und die Ansätze sofort am FACS-Calibur gemessen.

4.2.7 Funktionelle Analyse von Monozyten aus humanem Vollblut

4.2.7.1 Vollblutstimulation zur Bestimmung der spontanen und TLR- und NOD-Ligand induzierten Zytokinproduktion in Monozyten

Die Funktionalität von Monozyten wurde durch die *in vitro* Stimulation von Vollblut mit verschiedenen TLR- und NLR-Liganden anhand der Zytokinproduktion bestimmt. Ein Ansatz wurde ohne Zugabe eines Stimulus inkubiert, um eine Prä-Aktivierung der Monozyten nachzuweisen.

Von jedem Spender wurden 5 Ansätze mit jeweils 1 ml frischem heparinisierten Vollblut in einem 10 ml Zellkultur-Röhrchen mit verschiedenen Stimulanzien oder ohne Zugabe eines Stimulus für insgesamt 5 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert (Tabelle 9).

Nach 2 Stunden Prä-Inkubation mit den entsprechenden TLR- und NLR-Liganden wurden 10 µg/ml Brefeldin A zu jedem Ansatz hinzugegeben und die Stimulation für weitere drei Stunden im Brutschrank fortgesetzt. Brefeldin A unterbindet die cis-trans-Translokation der Proteine innerhalb des Golgiapparates. Da die synthetisierten Zytokine den Golgiapparat nicht mehr verlassen konnten, wurden sie innerhalb der Zelle akkumuliert und konnten so intrazellulär durch Antikörper detektiert werden.

Tabelle 9: Überblick der verwendeten Stimulanzen (Liganden) für die Vollblutstimulation

Ansatz	Rezeptor	Ligand	Konzentration
1	TLR-4	LPS (Lipopolysaccharid; ecoli O1111:B4)	100 ng/ml
2	NOD-2	MDP (Muramyl-dipeptid)	2,5 µg/ml
3	TLR-1/2	PAM ₃ CSK ₄ (synthetisches bakterielles tripalmitoyliertes-Lipopetid)	5 µg/ml
4	TLR-2/6	FSL-1 (synthetisches Fibroblasten-stimulierendes Lipoprotein-1)	1 µg/ml
5	---	Ohne; Negativkontrolle	---

Muramyl-dipeptid: Bestandteil des Peptidoglykans der bakteriellen Zellwand (gram+ und gram-);
 FSL-1: repräsentiert den N-terminalen Teil des Lipoproteins LP44 von *Mycoplasma salivarium*

Nach der insgesamt 5-stündigen Stimulation wurden die Erythrozyten durch die Zugabe von je 9 ml Lysepuffer für 15 min bei RT lysiert. Der Lysepuffer wurde nach der Zentrifugation bei 1500 rpm, 10 min bei RT durch Dekantieren entfernt. Für das Ablösen der Zellen von der Wand des Röhrchens wurde das Zellpellet mit 3 ml einer 2 mM Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat (EDTA)-Lösung für 15 min bei 37° C inkubiert und danach 1 min kräftig gemischt. Nach dem Waschen wurde die Zelloberfläche mit 400 µl einer 2 %igen Formalin-Lösung für 10 min bei 37° C fixiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschriff wurde das Zellpellet in 2 ml PBA resuspendiert und auf 2 Reaktionsgefäße aufgeteilt.

Für die Detektion intrazellulärer Zytokine ist es notwendig, die Zellmembran für Antikörper permeabel zu machen. Daher wurde jedem Färbeansatz Saponin hinzugefügt. Saponin ist ein pflanzliches Glykosid, das mit dem Cholesterol in der Zellmembran interagiert. In der Folge entstehen Poren, die jedoch nach dem Auswaschen des Saponins reversibel sind.

Die Zellen wurden pelletiert, in je 50 µl Färbelösung, die Saponin (1:10) und Beriglobin (1:50) enthielt, resuspendiert und für 15 min bei RT (dunkel) inkubiert (Tabelle 10).

Tabelle 10: Überblick über die verwendeten Antikörper für den intrazellulären Nachweis

Antikörper (Färbung 1)	Verdünnung	Antikörper (Färbung 2)	Verdünnung
CD68 PerCp-Cy5.5	1:50	CD68 PerCp-Cy5.5	1:50
IL-6 FITC	1:10	TNF-α FITC	1:200
P40 (IL12/23) PE	1:10	IL-1-ra PE	1:10
IL-1β Alexa 647	1:10	IL-10 APC	1:100

Nicht gebundene Antikörper wurden durch einen Waschschriff entfernt, die Zellen in 300 µl PBA resuspendiert und die Proben durchflusszytometrisch analysiert.

Die Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen beginnt erst nach 12-stündiger Stimulation [79]. Diese lange Stimulationzeit führt häufig zu einer Beeinträchtigung des Überlebens der Monozyten und macht eine Analyse im Durchflusszytometer schwierig. Daher erfolgte eine Analyse der IL-10 Produktion im Überstand der Stimulationsansätze mittels ELISA (BD) entsprechend den Herstellerangaben.

Für den Nachweis des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 wurden daher jeweils 500 µl frisches heparinisiertes Vollblut 1:2 mit Medium (RPMI) verdünnt und mit TLR- und NOD-Liganden (Tab. 9) für 18 h stimuliert. Die Zytokine wurden von den aktivierten Zellen ins Medium sekretiert und sind im Überstand nachweisbar. Nach 18 h wurde der Überstand der Stimulationsansätze nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C (2000 rpm) entnommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20° C bis zur Analyse gelagert.

4.2.7.2 Bestimmung der Phagozytose-Aktivität von Monozyten (*ex vivo*)

Für den Nachweis der Phagozytose-Aktivität von Monozyten im Vollblut wurden E-coli-Partikel verwendet, die mit *pHrodo-green* markiert waren. Das Fluorochrom *pHrodo-green* ist pH-sensitiv und kann außerhalb der Zelle (pH ~ 7) nicht fluoreszieren. Es erreicht erst bei einem pH-Wert von 4, also innerhalb des Phagosoms, sein Emissionsmaximum. Daher ist die Emission von *pHrodo-green* proportional zu den phagozytierten Biopartikeln. Die Fluoreszenz kann durchflusszytometrisch im PE-Kanal gemessen werden.

Die lyophilisierten Biopartikel wurden mit 2,2 ml Puffer B resuspendiert, vor jedem Test für 5 min im Ultraschallbad homogenisiert und 10 min auf Eis inkubiert. Der Phagozytostest wurde mit je 50 µl Vollblut durchgeführt. Für jeden Test wurden 2 Proben benötigt, eine Test-Probe und eine Negativ-Kontrolle. Als erstes wurden die Proben 10 min auf Eis inkubiert, um den Zellstoffwechsel zu minimieren. Nach der Zugabe von je 10 µl der pHrodo markierten Partikel wurde die Test-Probe bei 37° C im Brutschrank und die Negativ-Kontrolle bei 4° C auf Eis für 15 min inkubiert. Danach wurde die Phagozytose in der Test-Probe durch die Überführung auf Eis für 5 min gestoppt. In jeder Probe wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 100 µl Puffer A lysiert und nach 5 min die Zellen durch Zugabe von 1 ml Puffer B für 5 min fixiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml Puffer C und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 1500 rpm bei RT gewaschen. Nachfolgend wurden pro Ansatz 50 µl Färbelösung für 15 min mit Antikörpern gegen CD14 (APC; 1:10) in Anwesenheit von

Beriglobin (1:50) gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Zellpellet in 300 µl PBA aufgenommen und am FACS-Calibur analysiert.

4.2.8 Software

Tabelle 11: Verwendete Software

Software	Hersteller
Cell Quest	BD, Heidelberg; DE
FlowJo 7.6.4	TreeStar, Ashland; US
GraphPad Prism 5	GraphPad, SanDiego, US
Magellan Bioscience	Dynex, Chantilly, US
SPSS 19	IBM, Ehningen, DE
Endnote 7	Thomson Reuters, Frankfurt, DE

4.2.9 Statistik

Die deskriptive Analyse umfasste die Berechnung der Mittelwerte, Mediane, Minima und Maxima, sowie die Standardabweichung der Messwerte. Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht. Für die Analyse der Mittelwerte von unabhängigen Stichproben wurde der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test oder der Kruskal-Wallis-Test bei mehr als zwei Versuchsgruppen und für abhängige Stichproben der paarige T-Test verwendet.

Mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) wurden nicht parametrische Daten in logarithmierter Form analysiert. Die Ko-Varianzanalyse (ANCOVA) wurde angewandt, um den Einfluss von Zufallseffekten statistisch zu kontrollieren. Die Sensitivität ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein diagnostischer Test einen Patienten als krank diagnostiziert, während die Spezifität die Wahrscheinlichkeit beschreibt, mit der ein Gesunder als gesund diagnostiziert wird. Die Sensitivität wird als Quotient aus der Anzahl der richtig-positiv-klassifizierten Proben zu den richtig-positiv-klassifizierten Proben zuzüglich der falsch-negativ-klassifizierten Proben dargestellt. Die Spezifität ergibt sich aus dem Quotienten der richtig-negativ-klassifizierten Proben zu den richtig-negativ-klassifizierten Proben zuzüglich der falsch-positiv-klassifizierten Proben.

Für die Festlegung eines Schwellenwertes (*cut-offs*) wurde eine *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Analyse durchgeführt. Die ROC-Kurve ist eine Methode zur Beschreibung der Güte eines Diagnoseverfahrens unter der Berücksichtigung verschiedener

Schwellenwerte (*cut-offs*). Hierbei wird die Richtig-Positiv-Rate gegen die Richtig-Negativ-Rate für jeden möglichen Schwellenwert gegeneinander aufgetragen. Die Fläche unter der 45° Linie der ROC Kurve wird als *Area Under the Curve* (AUC) bezeichnet. In der Praxis liegt die Fläche jedoch oberhalb der Diagonalen. Dieser Wert ist ein wichtiges Maß für die Qualität des Klassifikators, um zwei Gruppen voneinander abgrenzen zu können. Die AUC kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen. Werden die Gruppen durch den gemessenen Parameter perfekt unterschieden, ist die AUC = 1, ist keine Unterscheidung möglich, ist die AUC = 0,5 und die Kurve liegt auf der 45° Linie.

Die Likelihood Ratio (LR) quantifiziert, wie sich die Kenntnis eines positiven oder negativen Testergebnisses auf das Risiko für das Vorliegen einer Erkrankung auswirkt. Die positive Likelihood Ratio (LR^+) gibt an, wievielmals wahrscheinlicher ein positiver Test bei Erkrankten als bei Gesunden eintritt. Die negative Likelihood Ratio (LR^-) gibt an, wievielmals wahrscheinlicher ein negatives Testergebnis bei Erkrankten als bei Gesunden eintritt. Dabei gelten folgende Kriterien:

LR^+	LR^-	diagnostische Evidenz
1-2	0,5-1	kaum relevant
2-5	0,2-0,5	schwach
5-10	0,1-0,2	hoch
>10	< 0,1	überzeugend

Die LR^+ berechnet sich aus Sensitivität/ 1-Spezifität und die LR^- wird aus 1-Sensitivität/Spezifität berechnet.

Das *Odd* (Chancenverhältnis) beschreibt das Verhältnis von Ereignissen zu Nicht-Ereignissen und die *Odds-Ratio* (OR) beschreibt das Verhältnis von Ereignissen zu Nicht-Ereignissen in zwei Gruppen. Die OR kann Werte zwischen 0 und ∞ annehmen; ein $OR < 1$ steht für die Schutzwirkung eines Parameters, während ein $OR > 1$ darauf hinweist, dass dieser Parameter die Erkrankung begünstigt.

Die Messwerte wurden als Punktdiagramme mit dem Median oder als Box-Plots mit dem Minimum und Maximum dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden durch Sternchen gekennzeichnet. Diese entsprechen folgenden Signifikanzniveaus: $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$. Zusammenhänge zwischen zwei Intervall-skalierten Faktoren wurden mit der parameterfreien Spearman-Korrelation berechnet und ein starker Zusammenhang wurde ab einem Korrelations-Koeffizienten von $r_s > 0,5$ angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung der diagnostischen und prognostischen Bedeutung ausgewählter Serumproteine für axSpA

Ziel, der im Folgenden dargestellten Analyse war es, Biomarker zu identifizieren, die in der klinischen Praxis für die Diagnosestellung oder Prognosebestimmung bei Patienten mit axSpA genutzt werden können.

Für die Analyse der Proteine standen insgesamt Serumproben von 217 Patienten mit axSpA der GESPIC zur Verfügung. 155 erfüllten die modifizierten New-York-Kriterien und wurden entsprechend als AS klassifiziert. 62 Patienten erfüllten entsprechend der Einschlusskriterien die ESSG-Kriterien, nicht aber die modifizierten New-York-Kriterien und wurden daher als nrSpA klassifiziert. Von allen Patienten waren Röntgenbilder der Wirbelsäule und der Sakroiliakalgelenke (SIG) zum Zeitpunkt Null (Baseline) und nach 2 Jahren vorhanden. Zusätzlich standen Serumproben von 57 Kontrollen ohne muskuloskelettale Erkrankungen zur Verfügung. In Tabelle 12 sind die von den Patienten und Kontrollen erhobenen demografischen und klinischen Parameter zusammengefasst.

Tabelle 12: Probandencharakteristik

Übersicht demografischer und klinischer Parameter der Patienten mit axialer Spondyloarthritis (axSpA), der Patienten mit nicht-röntgenologischer SpA (nrSpA) und der Patienten mit röntgenologischer SpA (AS) zu Baseline sowie der Kontrollen (Ko)

	axSpA (n=217)	nrSpA (n=62)	AS (n=155)	Ko (n=57)
Alter (Jahre) MW ± Stabw	37,3 ± 10,4	37,3 ± 9,9	37,3 ± 10,6	39,1 ± 11,2
Geschlecht (männlich) n (%)	110 (50,7)	19 (30,6)	91 (58,7) *	40 (70) \$
BMI MW ± Stabw	24,9 ± 4,9	23,4 ± 6,3	24,7 ± 4,2	-
HLA-B27 ⁺ n (%)	172 (79,3)	47 (75,8)	125 (80,6)	n.d.
Krankheitsdauer (Monate) MW ± Stabw	48,7 ± 32,1	36,0 ± 25,2	53,9 ± 33,1 *	-
Raucher n (%)	59 (27,2)	16 (25,8)	43 (27,7)	-
CED n (%)	3 (1,4)	1 (1,6)	2 (1,3)	-
Periphere Arthritis n (%)	28 (12,9)	11 (17,7)	17 (11,0)	-
BASDAI (MW ± Stabw)	3,9 ± 2,1	4,0 ± 1,8	3,8 ± 2,2	-
BASFI (MW ± Stabw)	2,8 ± 2,3	2,7 ± 2,1	2,9 ± 2,4	-
CRP [mg/l] MW ± Stabw	9,6 ± 15,1	6,5 ± 14,0	10,9 ± 15,4 *	n.d.
BSG [mm/h] MW ± Stabw	16,5 ± 16,1	12,0 ± 9,4	18,1 ± 17,8	n.d.
Therapie mit NSAR n (%)	131 (60,4)	37 (59,7)	94 (60,6)	-
Therapie mit DMARDs n (%)	30 (13,8)	4 (6,5)	26 (16,8) *	-
Therapie mit syst. GC n (%)	3 (1,4)	1 (1,6)	2 (1,3)	-
Therapie mit TNF-α blockern n (%)	6 (2,8)	0	6 (3,9) *	-
≥ ein Syndesmophyt (lat.) n (%)	44 (20,3)	4 (6,5)	40 (25,8) *	-
≥ ein Syndesmophyt (a.p.+lat.) n (%)	57 (26,3)	5 (8,1)	52 (33,5) *	-
mSASSS MW ± Stabw	4,4 ± 8,5	1,8 ± 4,6	5,5 ± 9,4 *	-

axSpA - axiale Spondyloarthritis, nrSpA - nicht röntgenologische Spondyloarthritis, AS - Ankylosierende Spondylitis, Ko - Kontrollen, BMI - body mass index, BASDAI - bath ankylosing spondylitis disease activity index, BASFI - bath ankylosing spondylitis functional index, CRP - C reactive protein, BSG - Blut-Senkungs-Geschwindigkeit, NSAR - nicht steroidale Anti-Rheumatika, DMARD - disease modifying anti-rheumatic drugs, GC - Glucocorticoide, mSASSS - modified stoke ankylosing spondylitis spinal score, CED - chronisch entzündliche Darmerkrankungen, lat. - lateral, a.p. - anteroposterior; * p-Wert - Unterschiede nr-axSpA vs. AS, \$ p-Wert - Unterschiede axSpA vs Ko

Zwischen den Untersuchungsgruppen bestanden keine Unterschiede im Alter, jedoch befand sich in der Kontrollgruppe ein höherer Anteil an Männern im Vergleich zu den Patientengruppen. In der Patientengruppe mit AS waren mehr als 50 % männlich, während es in der nrSpA-Gruppe nur etwa 30 % waren. Infolge der Einschlusskriterien wiesen die AS-Patienten eine längere Krankheitsdauer auf als die nrSpA-Patienten. Während sich die Krankheitsaktivität (BASDAI), die Funktionalität (BASFI) und der HLA-B27 Status in den Patientengruppen nicht unterschieden, waren die CRP-Serumkonzentrationen bei AS-Patienten höher als bei nrSpA-Patienten. Zum Zeitpunkt des Studieneintritts wurden in beiden Patientengruppen ~ 60 % der Patienten mit NSAR behandelt, während nur bei AS-Patienten TNF- α Blocker angewendet wurden. Bei 1/3 der AS-Patienten war zu Beginn der Studie mindestens ein Syndesmophyt in der Wirbelsäule sichtbar, während dies nur bei 8 % der nrSpA-Patienten der Fall war. Ebenso lag der mSASSS bei AS-Patienten höher ($5,5 \pm 9,4$) als bei Patienten mit nrSpA ($1,8 \pm 4,6$; $p < 0,0001$). Alle klinischen und demografischen Parameter sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

5.1.1 Diagnostische Marker

Für die Diagnosestellung der axSpA wird gegenwärtig nur die Bestimmung von HLA-B27 genutzt, welches jedoch nur eine Risikobewertung darstellt. Als Laborparameter werden zusätzlich die CRP-Konzentration im Serum und die BSG für die Diagnose herangezogen. Erhöhte CRP-Konzentrationen können nur in 40-60 % der SpA-Patienten detektiert werden [1-3]. Daher werden sensitivere serologische Biomarker für die Diagnosestellung der axSpA benötigt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der Serum-Konzentrationen von 13 Proteinen in 217 GESPIC-Patienten zu Baseline und 57 Kontrollen. Es wurden Proteine ausgewählt, die mit Entzündung oder Prozessen des Knochenumbaus assoziiert sind und mit Hilfe kommerzieller ELISA quantifiziert werden können. Im ersten Teil der Arbeit wurde ein potenzieller diagnostischer Nutzen dieser Parameter untersucht.

Zunächst wurde mit Hilfe einer univariaten Varianzanalyse überprüft, ob die Biomarker mit den demografischen und klinischen Parametern assoziiert waren. Da die Konzentrationen der Biomarker nicht normal verteilt vorlagen, wurden diese in logarithmierter Form als abhängige Variablen verwendet. Die Faktoren waren entweder intervall- oder nominalskaliert und wurden als unabhängige Variable in die Analyse eingesetzt (Tab 13).

Tabelle 13: Univariate Varianzanalysen (ANOVA) zur Bestimmung der Assoziation von klinischen und demografischen Parametern mit den Serumspiegeln der Biomarker

Mit Hilfe der univariaten Varianzanalyse wurde der Einfluss kategorialer Parameter (z.B. Geschlecht) auf die Konzentrationen der Biomarker überprüft. Für den Einfluss von stetigen Parametern (z.B. Alter) auf die Konzentrationen der Biomarker wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Dargestellt sind die p-Werte der Mittelwertunterschiede; signifikante Unterschiede sind fett gedruckt.

BMI – Body mass index, NSAR – nicht steroidale Anti-Rheumatika, DMARDs – disease modifying anti rheumatic drugs, BASDAI – bath ankylosing spondylitis disease activity index, BASFI – bath ankylosing spondylitis functional index, BSG – Blut-Senkungs-Geschwindigkeit, CRP – C-reaktives Protein, SD – Syndesmophyten zu Baseline (zum Zeitpunkt des Studieneintritts), mSASSS – modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score zu Baseline

	Knochen- und Knorpelabbau				Knochen- und Knorpelaufbau						Entzündung		
	CTX-II	NTX-I	MMP-3	sRANKL	BMP-2	BMP-7	BALP	PINP	PIINP	OPG	sCD14	LBP	VEGF
Alter	<i>0,002</i>	0,131	0,413	0,142	0,400	0,126	0,972	0,861	0,448	0,413	0,420	0,224	0,441
Geschlecht	0,328	0,359	<i>0,018</i>	0,312	0,075	0,610	<i>0,013</i>	0,627	<i>0,002</i>	<i>0,006</i>	0,328	0,711	0,210
BMI	<i>0,015</i>	0,362	0,425	0,562	0,881	0,892	0,075	0,722	0,931	0,478	0,844	<i>0,005</i>	0,485
HLA-B27 Status	0,129	0,249	0,313	0,324	0,146	0,212	0,890	0,268	0,628	0,923	0,957	0,305	0,677
Krankheitsdauer	0,770	0,819	0,973	0,054	0,264	0,468	0,713	<i>0,014</i>	0,144	0,402	0,822	0,063	0,573
Raucher Status	0,338	0,073	0,600	0,594	0,984	0,114	0,518	<i>0,003</i>	0,550	<i>0,009</i>	0,783	0,257	<i>0,030</i>
NSAR Therapie	0,218	0,305	0,628	0,291	0,511	0,993	0,483	0,112	0,843	0,750	0,647	0,300	0,132
DMARDs Therapie	0,146	0,199	0,611	0,482	0,078	0,138	0,605	0,538	0,900	0,971	0,372	0,089	0,588
BASDAI	0,051	0,499	0,834	0,358	0,767	0,084	0,261	0,138	0,706	0,992	0,147	0,222	0,667
BASFI	<i>0,003</i>	0,900	0,865	0,790	0,214	0,070	0,640	<i>0,044</i>	0,118	0,438	0,446	<i>0,035</i>	0,880
BSG	0,351	0,147	0,068	0,692	0,107	0,640	0,836	<i>0,008</i>	<i>0,012</i>	<i>0,017</i>	0,166	<i>0,000</i>	<i>0,005</i>
CRP	0,750	<i>0,013</i>	<i>0,000</i>	0,609	0,537	0,810	0,436	<i>0,001</i>	<i>0,047</i>	<i>0,014</i>	0,530	<i>0,000</i>	<i>0,000</i>
Sacroilitis	0,649	0,523	0,526	0,390	<i>0,022</i>	0,673	0,825	<i>0,007</i>	<i>0,005</i>	0,864	0,137	<i>0,002</i>	0,223
SD	<i>0,001</i>	0,986	0,460	0,151	<i>0,000</i>	0,317	0,868	<i>0,007</i>	<i>0,003</i>	0,510	0,090	<i>0,030</i>	0,861
mSASSS	<i>0,002</i>	0,350	0,349	0,885	<i>0,001</i>	0,299	0,208	<i>0,025</i>	<i>0,027</i>	0,513	0,364	<i>0,038</i>	0,082

Die univariate Varianzanalyse zeigte, dass einige Biomarker mit demografischen Parametern assoziiert waren. Es konnte ein Einfluss des Alters auf die Serumkonzentrationen von CTX-II, sowie ein Einfluss des Geschlechts auf die Serumkonzentrationen von MMP-3, BALP, PIINP und OPG festgestellt werden. Der BMI war mit CTX-II und LBP, die Krankheitsdauer mit PINP assoziiert. Der Raucherstatus wies eine Assoziation zu den Serumkonzentrationen von PINP, OPG und VEGF auf (Tab. 13).

Bei den klinischen Parametern bestand eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein einer Sakroilitis und dem Vorhandensein von SD zu Baseline zu den Serumkonzentrationen von BMP-2, PINP, PIINP und LBP sowie eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein von SD zu Baseline und den Serumkonzentrationen von CTX-II. Der mSASSS zeigte eine Assoziation mit den Serumkonzentrationen von CTX-II, BMP-2, PINP, PIINP und LBP. Der Entzündungsparameter CRP war stärker mit PINP, OPG, LBP und VEGF assoziiert als die BSG und wies auch eine Assoziation zu NTX-I und MMP3 auf, während dies für die BSG nicht gezeigt werden konnte. Einzig für die Serumkonzentrationen von PIINP konnte eine stärkere Assoziation mit der BSG als mit dem CRP festgestellt werden. In Bezug auf die Behandlung konnte keine Assoziation zwischen einer DMARD-Behandlung oder der zwischen einer

NSAR-Behandlung und einem der analysierten Biomarker nachgewiesen werden. Der BASFI wies einen Zusammenhang zu den Markern CTX-II, PINP und LBP auf, während der BASDAI mit keinem der untersuchten Marker assoziiert war (Tab. 13).

Einige demografischen und klinischen Parameter lagen in den verschiedenen Gruppen ungleich verteilt vor. Daher wurden die signifikanten Parameter einer Kovarianz-Analyse unterzogen um mögliche *Confounder* (Störvariablen) zu berücksichtigen. Des Weiteren korrelierten die CRP und BSG Werte ($r=0,665$, $p<0,001$), die BASDAI- und BASFI-Werte ($r=0,774$, $p<0,001$), sowie der mSASSS und das Vorhandensein von SD zu Baseline ($r=0,595$, $p<0,001$) miteinander. Deshalb wurden in die Kovarianz-Analyse entsprechend der höheren Signifikanz nur der CRP-Wert sowie das Vorhandensein von SD zu Baseline in die Analyse eingeschlossen (Tab. 14).

Tabelle 14: Kovarianz-Analyse (ANCOVA) zwischen den Biomarker-Konzentrationen und klinischen/ demografischen Parametern bei Patienten mit axSpA

Der Einfluss der signifikant assoziierten Co-Faktoren auf die Varianz der Biomarker-Konzentrationen wurde durch eine Kovarianz-Analyse weiter untersucht. Dargestellt sind die p-Werte der univariaten Varianzanalyse und die p-Werte* der Kovarianz-Analyse. *BMI* – Body mass index, *CRP* – C-reaktives Protein, *SD* – Syndesmophyten zu Baseline (zum Zeitpunkt des Studieneintritts)

Co-Faktor	Faktor	p-Wert	p-Wert*
BMI	LBP	0,005	0,010
CRP	LBP	0,000	0,000
	VEGF	0,000	0,000
	MMP-3	0,000	0,001
	OPG	0,014	0,008
	PINP	0,001	0,014
	NTX-I	0,013	0,036
	PIINP	0,012	0,048
Geschlecht	OPG	0,006	0,000
	PIINP	0,002	0,011
	BALP	0,013	0,013
Raucherstatus	OPG	0,009	0,003
	PINP	0,003	0,021
Sacroilitis	LBP	0,002	0,000
SD BL	BMP-2	0,000	0,000
	CTX-II	0,001	0,005

* adjustiert für Co-Faktoren

Während für die Biomarker CTX-II und BMP-2 eine Assoziation zu strukturellen Veränderungen an der Wirbelsäule (SD zu Baseline) gezeigt werden konnte, waren die Biomarker LBP, VEGF, MMP-3, OPG, PINP, NTX-I und PIINP vorwiegend mit Entzündung, d.h. mit dem CRP-Wert assoziiert. Für OPG, PIINP und BALP konnten geschlechtsspezifische

Unterschiede auch nach der Adjustierung gezeigt werden. Der Raucherstatus war weiterhin mit OPG und PINP und die Sakroilitis mit LBP assoziiert (Tab. 14).

Als Nächstes wurde eine Analyse der Biomarker-Konzentrationen bei axSpA-Patienten und gesunden Kontrollen durchgeführt. Da zum Teil nicht ausreichend Proben-Material für die Bestimmung aller 13 Proteine vorhanden war, ist die Anzahl der analysierten Proben für jeden Parameter separat aufgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabw) sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Ergebnisse wurden für das Alter und das Geschlecht adjustiert, um diese Parameter als mögliche Störvariablen auszuschließen (Tab. 15).

Tabelle 15: Quantitative Analyse von Serumproteinen bei Patienten mit axSpA und Kontrollen

Nachweis verschiedener Proteine, die mit Knochen-/ Knorpelumbau oder Entzündung assoziiert sind, in Serumproben von axSpA Patienten und gesunden Kontrollen mittels kommerzieller ELISA. Für die Varianzanalyse wurden logarithmierte Werten verwendet, da nicht alle Messwerte normal verteilt vorlagen. (*p*-Wert nach univariater Varianzanalyse; *p*-Wert* nach Adjustierung für Alter und Geschlecht; signifikante Unterschiede sind fett gedruckt.)

	Kontrollen			axSpA Patienten				
Knochen/Knorpel Abbau	n	MW	Stabw.	n	MW	Stabw.	p-Wert	p-Wert*
CTX-II (ng/ml)	14	0,58	0,85	85	1,89	2,87	0,001	0,001
NTX-I (nM BCE)	25	11,93	6,00	148	15,85	9,38	0,125	0,060
MMP-3 (ng/ml)	30	32,68	18,13	152	36,80	50,10	0,232	0,373
sRANKL (nmol/ml)	30	0,87	0,80	152	2,10	2,71	0,011	0,016
Knochen/Knorpel Aufbau								
BMP-2 (ng/ml)	30	1486,52	1669,25	152	3833,45	3267,80	< 0,001	< 0,001
BMP-7 (ng/ml)	12	5,54	4,25	89	18,87	26,22	0,531	0,597
BALP (U/l)	30	13,48	4,09	152	13,79	5,08	0,907	0,631
PINP (ng/ml)	37	20,52	6,96	207	23,26	19,87	0,457	0,490
PIINP (ng/ml)	22	103,27	75,20	112	146,20	137,26	0,361	0,085
OPG (nmol/ml)	29	6,76	3,12	152	9,33	5,00	0,004	0,007
Entzündung								
LBP (µg/ml)	19	19,23	15,54	187	43,13	25,97	< 0,001	< 0,001
sCD14 (µg/ml)	22	2,01	0,83	170	2,05	0,63	0,651	0,799
VEGF (pg/ml)	30	442,32	306,37	135	408,84	270,16	0,441	0,417

* adjustiert für Alter und Geschlecht

Die quantitative Analyse der Serumproteine zeigte nach der Adjustierung für das Alter und Geschlecht erhöhte Konzentrationen bei axSpA-Patienten für die Knochen- und Knorpelabbaumarker CTX-II ($p=0,001$) und sRANKL ($p=0,016$), für die Knochen- und Knorpelaufbaumarker BMP-2 ($p<0,001$) und OPG ($p=0,007$), sowie für den Entzündungsmarker LBP ($p<0,001$) im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Für die Serumproteine NTX-I, PIINP, BMP-7, MMP-3, PINP, BALP, VEGF und sCD14 konnten keine

signifikanten Unterschiede zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen festgestellt werden (Tab. 15).

Nachfolgend wurden die Biomarker CTX-II, sRANKL, BMP-2, OPG und LBP auf ihr Potenzial als Diagnosemarker untersucht. Für die Diskriminierung zwischen normalen und erhöhten Serumkonzentrationen der Biomarker wurde die ROC-Analyse genutzt, um einen Schwellenwert für jeden Biomarker festzulegen. Mit Hilfe des Youden-Index wurde der Schwellenwert (*cut-off*) mit der höchsten Sensitivität und Spezifität ermittelt und die Likelihood Ratios (LRs) berechnet, die eine Aussage über die diagnostische Evidenz zulassen.

In Abbildung 12 sind die ROC-Analysen und Box-Plots für die Serum-Konzentrationen der Biomarker CTX-II, sRANKL, BMP-2, OPG und LBP von axSpA-Patienten und gesunden Kontrollen zu sehen. Als Referenzkategorie wurden die Serumkonzentrationen der gesunden Kontrollen verwendet. Mit dieser Analyse wurden die optimalen cut-offs für die Diskriminierung zwischen Kontrolle (gesund) und Patient (krank) und deren Sensitivität und Spezifität festgelegt (Tab. 16).

Für sRANKL wurde der optimale cut-off mit einer Sensitivität von 66 % und einer Spezifität von 53 % bei 0,58 nmol/l festgelegt. Der diagnostische Wert wurde als kaum relevant eingestuft, da die LR^+ bei 1,4 lag.

Der cut-off für OPG wurde bei 5,96 nmol/l mit einer Sensitivität von 83 % und einer Spezifität von 52 % festgelegt. Aufgrund der geringen Spezifität von OPG lag die LR^+ bei 1,7. Der diagnostische Wert von OPG kann daher als kaum relevant eingestuft werden.

Für CTX-II lag der cut-off bei 0,45 ng/ml mit einer Sensitivität von 77 % und einer Spezifität von 85 %. Die LR^+ lag mit 5,1 höher als bei OPG und der diagnostische Wert von CTX-II kann als hoch eingestuft werden.

Der cut-off für BMP-2 lag bei 4000 ng/ml mit einer Sensitivität von 50 % und einer Spezifität von 94 %. Durch die berechnete LR^+ von 8,3 kann BMP-2 als Marker mit hohem diagnostischem Wert eingestuft werden.

Für LBP lag der cut-off bei 44,7 µg/ml mit einer Sensitivität von 49 % und einer Spezifität von 100 %. Die optimale Spezifität ergab eine LR^+ von 98; damit stellt LBP einen Marker mit überzeugender diagnostischer Evidenz dar (Tab. 16)

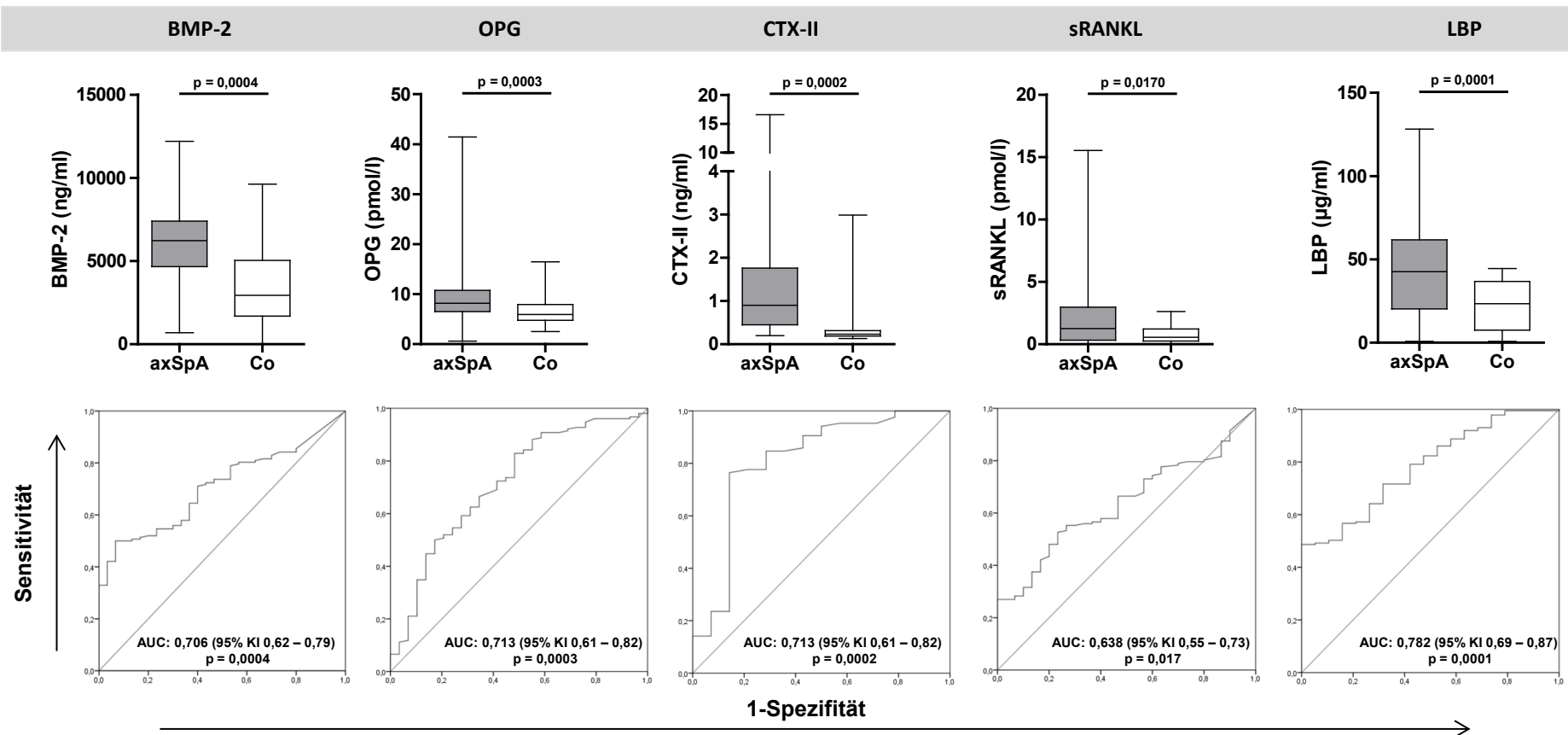


Abbildung 12: Potenzielle Biomarker für die Diagnose der axSpA

Darstellung der Serum-Konzentrationen für axSpA-Patienten und Kontrollen als Box-Whisker-Plots und der ROC Kurven zur Bestimmung des optimalen cut-off der Biomarker für die Unterscheidung von axSpA Patienten und Kontrollen

Die Konzentrationen der Biomarker BMP-2 (I), OPG (II), CTX-II (III), sRANKL (IV) und LBP (V) im Serum von axSpA-Patienten und Kontrollen sind durch Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Box repräsentiert die 25. und 75. Perzentile mit dem Median (Querbalken), die Whisker kennzeichnen das Minimum und Maximum der Messwerte. Mit Hilfe der gemessenen Serumkonzentrationen der Biomarker wurden ROC-Kurven angefertigt und anhand der höchsten Sensitivität und Spezifität der optimale cut-off ermittelt, der eine Diskriminierung zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen erlaubt. *axSpA* – axiale Spondyloarthritis, *AUC* – area under the curve, *KI* – Konfidenz Interval, *ROC* – receiver operating characteristic

Tabelle 16: Übersicht über die Evidenz ausgewählter Serumproteine für die Diagnose einer axSpA

Mit Hilfe der ROC-Analyse wurden für die Biomarker, bei denen signifikante Unterschiede zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen festgestellt wurden, die optimalen cut-offs für die Diskriminierung festgelegt.

Weiterhin ist für jeden Biomarker die AUC und die Sensitivität und Spezifität des ermittelten cut-off angegeben.

Daraus wurde die LR^+ berechnet, die ein Maß für die diagnostische Evidenz darstellt.

AUC – area under the curve, KI – Konfidenzintervall, LR^+ - positive Likelihood-Ratio

Biomarker	cut-off	AUC	KI	p	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	LR+	Evidenz
sRANKL (nmol/l)	0,58	0,638	0,55-0,73	0,0170	66	53	1,4	kaum relevant
OPG (nmol/l)	5,96	0,713	0,61-0,82	< 0,0001	83	52	1,7	kaum relevant
CTX-II (ng/ml)	0,45	0,713	0,61-0,82	< 0,0001	77	85	5,1	hoch
BMP-2 (ng/ml)	4000	0,706	0,62-0,79	< 0,0001	50	94	8,3	hoch
LBP (µg/ml)	44,7	0,782	0,69-0,87	< 0,0001	49	100	98,0	überzeugend

Der Vergleich der AUC zwischen den analysierten Biomarkern zeigte für LBP mit 0,782 (KI 0,69-0,87) die größte Fläche. Der cut-off von 44,7 µg/ml kann zu 100 % Kontrollen von axSpA-Patienten diskriminieren (Spezifität), jedoch können nur ca. 50 % der Patienten (Sensitivität) anhand der LBP-Konzentration erkannt werden, d.h. der Nachweis von niedrigen LBP Serumkonzentrationen schließt das Vorhandensein von axSpA nicht aus.

Für die Identifikation diagnostisch relevanter Biomarker wurden Probanden ohne entzündlichen Rückenschmerz oder muskuloskelettale Symptome als Kontrollgruppe analysiert. Die Eignung dieser Marker für die Diagnose der axSpA in der klinischen Praxis muss in weiteren Patientenkollektiven, z.B. bei Patienten mit Rückenschmerz-Symptomatik oder Patienten mit Arthrose oder Osteoporose, evaluiert werden.

5.1.2 Marker für röntgenologische Progression

Ein charakteristisches Merkmal der axSpA ist die Ausbildung von Syndesmophyten (SD) zwischen den Wirbelkörpern, die zu einer erheblichen Einschränkung der Beweglichkeit der Wirbelsäule des Patienten führen können. Das Vorhandensein dieser Veränderungen in der Wirbelsäule wird anhand von Röntgenbildern erfasst.

Ziel war es, einen Biomarker oder auch eine Kombination aus Biomarkern zu finden, mit deren Hilfe schon frühzeitig das Risiko einer Progression solcher strukturellen, prognostisch entscheidenden Veränderungen angezeigt werden kann.

Für diese Arbeit wurde die röntgenologische Progression zum einen durch die Bestimmung des mSASSS zum anderen durch den Nachweis von Syndesmophyten (SD) zu Baseline und nach 2 Jahren festgelegt.

Der mSASSS erfasst dabei Veränderungen wie Erosionen, Sklerose, Kastenwirbelbildung, SD-Neubildung und die Brückenbildung zweier SD im Bereich der zervikalen Wirbelsäule (C2 – Th1) und der lumbalen Wirbelsäule (T12 – S1) in lateralen (seitlichen) Röntgenaufnahmen. Für den Nachweis von SD wurden zusätzlich zu den lateralen (seitlichen) auch antero-posteriore (von vorn nach hinten) Röntgenaufnahmen hinzugezogen. Dadurch können SD an den rechten und linken Wirbelkörperkanten erfasst werden.

Die röntgenologische Progression wurde für diese Arbeit als Anstieg des mSASSS um 2 oder mehr Punkte innerhalb von 2 Jahren definiert. Die SD-Progression wurde als Neubildung von mindestens einem SD an einer Stelle ohne SD zu Baseline oder die Brückenbildung zwischen zwei Wirbeln durch das Zusammenwachsen von zwei einzelnen SD im Zeitraum von 2 Jahren definiert.

Innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs wiesen 23 Patienten nach 2 Jahren eine Progression der Syndesmophyten (SD-Progression) und 27 Patienten eine Progression des mSASSS (mSASSS-Progression) um 2 oder mehr Punkte auf. Die Co-Varianzanalyse der Biomarker im Serum der axSpA Patienten hatte schon gezeigt, dass zwischen einigen Biomarkern eine Assoziation mit dem Bestehen struktureller Schäden vorhanden war.

Im Folgenden wurden die Biomarker-Konzentrationen im Serum von axSpA-Patienten mit und ohne mSASSS- oder SD-Progression analysiert.

Von den Biomarkern, die mit Knochen-/Knorpel-Abbau assoziiert sind, waren nur die Konzentrationen von MMP-3 ($p=0,028$) bei Patienten mit SD-Progression erhöht. Bei Biomarkern die mit Knochen-/ Knorpel-Aufbau assoziiert waren, konnten erhöhte Konzentrationen für BMP-2 ($p=0,002$) und PINP ($p=0,002$) bei Patienten mit SD-Progression nachgewiesen werden. Außerdem waren die Entzündungsmarker LBP ($p=0,014$) und VEGF ($p=0,041$) in Serumproben von Patienten mit Progression der SD im Vergleich zu Patienten ohne Progression erhöht (Tab. 17A).

Wurde die röntgenologische Progression durch einen Anstieg des mSASSS um mindestens 2 Punkte definiert, war von den Biomarkern, die Knochen-/ Knorpel-Abbau anzeigen, NTX-I ($p=0,044$) und von den Biomarkern, die mit Knochen-/ Knorpel-Aufbau assoziiert waren BMP-2 ($p=0,006$) und PINP ($p=0,002$) bei Patienten mit Progression, erhöht. Von den Entzündungsmarkern konnte für VEGF ($p=0,027$) eine erhöhte Konzentration bei Patienten

mit röntgenologischer Progression im Vergleich zu Patienten ohne Progression detektiert werden (Tab. 17B).

Tabelle 17: Analyse von Biomarker-Konzentrationen im Serum von axSpA-Patienten in Abhängigkeit von der röntgenologischen Progression

Vergleich der Biomarker-Konzentrationen des Knorpel- und Knochenmetabolismus und von Entzündungsmarkern im Serum axSpA-Patienten mit und ohne röntgenologische Progression definiert als **(A)** Neubildung bzw. Wachstum von bereits vorhandenen Syndesmophyten (SD) oder **(B)** als Anstieg des mSASSS um mindestens 2 Punkte innerhalb von 2 Jahren. Dargestellt sind die Mittelwerte der Biomarker-Konzentrationen und die p-Werte des Mann-Whitney-U-Tests; p-Werte < 0,05 werden als signifikant angesehen. *mSASSS = modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spinal Score*; Stabw – Standard-Abweichung, n – Anzahl

A) Syndesmophyten Wachstum oder Neubildung							
	keine Progression			Progression			
Knochen/Knorpel Abbau	n	MW	± Stabw.	n	MW	± Stabw.	p-Wert
CTX-II (ng/ml)	63	2,28	3,24	22	0,79	0,55	0,061
NTX-I (nM BCE)	106	16,41	9,76	23	14,84	7,07	0,696
MMP-3 (ng/ml)	110	35,53	55,79	23	47,46	35,92	0,028
sRANKL (nmol/ml)	110	2,10	2,77	23	2,45	3,28	0,515
Knochen/Knorpel Aufbau							
BMP-2 (ng/ml)	110	3831,86	3215,55	23	6418,70	2488,33	0,002
BMP-7 (ng/ml)	67	20,26	27,71	22	14,62	21,01	0,182
BALP (U/l)	110	13,51	5,28	23	14,07	4,28	0,400
PINP (ng/ml)	163	20,87	15,79	23	42,12	35,02	0,002
PIINP (ng/ml)	82	154,73	150,35	16	161,65	78,01	0,215
OPG (nmol/ml)	110	9,41	5,49	23	8,93	3,01	0,934
Entzündung							
LBP (µg/ml)	145	42,98	25,45	18	61,42	28,78	0,014
sCD14 (µg/ml)	134	2,04	0,66	15	1,91	0,60	0,362
VEGF (pg/ml)	154	404,28	306,74	18	579,19	385,41	0,041

B) mSASSS Progression um 2 oder mehr Punkte							
	keine Progression			Progression			
Knochen/Knorpel Abbau	n	MW	± Stabw.	n	MW	± Stabw.	p-Wert
CTX-II (ng/ml)	65	2,20	3,21	20	0,89	0,65	0,252
NTX-I (nM BCE)	105	15,53	9,25	25	19,43	9,86	0,044
MMP-3 (ng/ml)	109	37,53	56,63	25	37,27	31,81	0,379
sRANKL (nmol/ml)	109	1,98	2,65	25	3,02	3,53	0,086
Knochen/Knorpel Aufbau							
BMP-2 (ng/ml)	109	3892,77	3157,24	25	5875,59	3154,97	0,006
BMP-7 (ng/ml)	69	19,17	25,52	20	17,81	29,18	0,260
BALP (U/l)	109	13,68	5,15	25	13,36	4,94	0,920
PINP (ng/ml)	161	20,94	16,25	27	37,96	32,72	0,002
PIINP (ng/ml)	81	154,35	150,49	17	163,08	82,95	0,195
OPG (nmol/ml)	109	9,45	5,52	25	8,71	2,82	0,973
Entzündung							
LBP (µg/ml)	144	43,19	25,93	23	53,00	27,46	0,133
sCD14 (µg/ml)	134	2,07	0,62	18	1,76	0,84	0,287
VEGF (pg/ml)	150	402,15	309,31	22	562,20	319,19	0,027

Im nächsten Schritt wurden die signifikant unterschiedlichen Biomarker NTX-I, MMP-3, BMP-2, PINP, LBP und VEGF auf ihr Potenzial als Prognosemarker für röntgenologische Progression hin untersucht. Dazu wurde eine weitere ROC-Analyse durchgeführt, um den optimalen cut-off für jeden Marker festzulegen, der eine Diskriminierung zwischen den Patienten mit und ohne Progression erlaubt. Als Referenzkategorie wurden die Biomarker-Konzentrationen der Patienten ohne röntgenologische Progression verwendet.

Die Serum-Konzentrationen von NTX-I zeigten nur bei Patienten mit und ohne mSASSS Progression signifikante Unterschiede ($p=0,044$); es wurde ein cut-off von 11 nM BCE mit einer Sensitivität von 84 % und einer Spezifität von 43 % und eine AUC von 0,628 ermittelt (Abb. 13A).

Bei der Analyse der Serum-Konzentrationen von MMP-3 konnten Unterschiede nur für die Progression der SD ($p=0,028$) gezeigt werden. Mit Hilfe der ROC-Analyse wurde ein cut-off von 35 ng/ml ermittelt (Sensitivität 52 %; Spezifität 71 %). Die AUC lag bei 0,646 (Abb. 13B).

Für BMP-2 lag der cut-off bei 4000 pg/ml für die Unterscheidung von Patienten mit und ohne SD-Progression (Sensitivität 91 %; Spezifität 51 %), die AUC lag bei 0,712 (Abb. 13C) und für die mSASSS Progression bei 7800 pg/ml (Sensitivität 36 %; Spezifität 91 %) mit einer AUC von 0,679 (Abb. 13D).

Für die Unterscheidung von Patienten mit und ohne SD-Progression wurde für PINP ein cut-off von 28 ng/ml mit einer Sensitivität von 57 % und einer Spezifität von 77 % ermittelt mit einer AUC von 0,701 (Abb. 14E). Für die mSASSS Progression um mindestens 2 Punkte konnte ein cut-off von 24 pg/ml mit einer Sensitivität von 63 % und einer Spezifität von 70 % festgelegt werden. Die AUC lag bei 0,684 (Abb. 13F).

Der cut-off für VEGF wurde auf 700 pg/ml mit einer Sensitivität von 33 % und einer Spezifität von 88 % für die mSASSS Progression festgelegt, die AUC lag bei 0,648 (Abb. 13G). Für die SD-Progression wurde ein cut-off von 600 pg/ml mit einer Sensitivität von 39 % und einer Spezifität von 83 % mit einer AUC von 0,648 festgelegt (Abb. 13H).

Für LBP wurde ein cut-off von 41 µg/ml für die SD-Progression (Sensitivität 83 %; Spezifität 48 %) ermittelt, die AUC lag bei 0,679 (Abb. 13I).

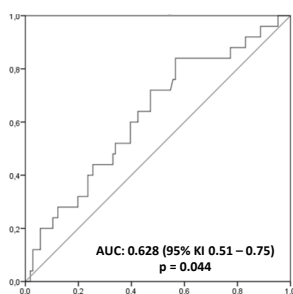
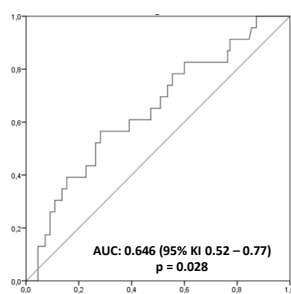
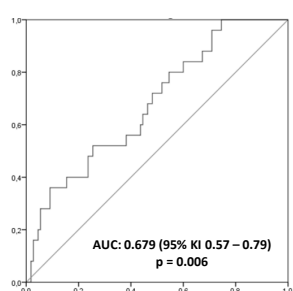
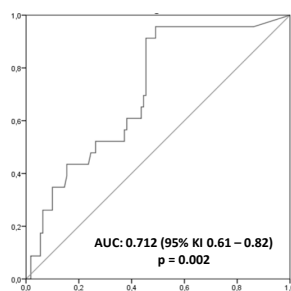
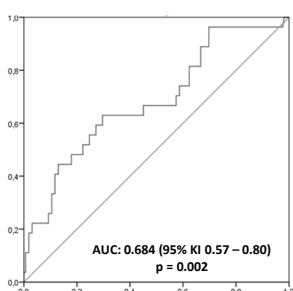
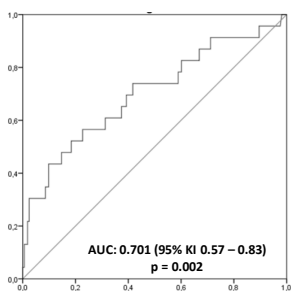
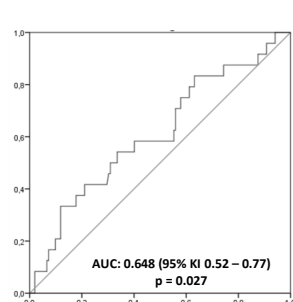
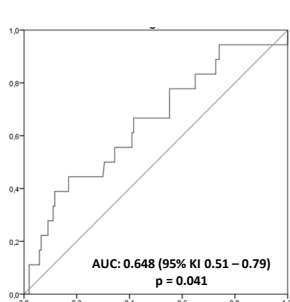
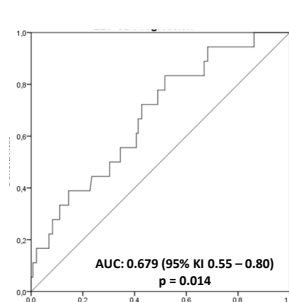
Knorpel- und Knochenabbau**A) NTX-I
mSASSS Progression****B) MMP-3
SD Progression****Knorpel- und Knochenaufbau****C) BMP-2
mSASSS Progression****D) BMP-2
SD Progression****E) PINP
mSASSS Progression****F) PINP
SD Progression****Entzündung****G) VEGF
mSASSS Progression****H) VEGF
SD Progression****I) LBP
SD Progression**

Abbildung 13: Potenzielle Biomarker für die Prognose der röntgenologischen Progression
Darstellung der ROC Analysen zur Bestimmung des cut-off für die Biomarker die mit Knochenumbau (A-F)
oder Entzündung (G-I) assoziiert sind bei axSpA Patienten

Mit Hilfe der gemessenen Serumkonzentrationen der Biomarker wurden ROC-Kurven angefertigt und anhand der höchsten Sensitivität und Spezifität der optimale cut-off ermittelt, der eine Diskriminierung zwischen axSpA-Patienten mit und ohne röntgenologischer Progression erlaubt.

AUC – area under the curve (Fläche unter der Kurve), KI – Konfidenzintervall, SD – Syndesmophyten

Auf Grundlage der ermittelten cut-offs wurde der prädiktive Wert der Biomarker, d.h. die Vorhersagekraft für die röntgenologische Progression, überprüft. Als Maß für die Vorhersagekraft wurde die *Odds-Ratio* (OR) mit Hilfe der binären logistischen Regression berechnet. Zusätzlich wurde der Einfluss von Risikofaktoren, die in früheren Untersuchungen eine Assoziation mit röntgenologischer Progression zeigten, in dem hier verwendeten Patientenkollektiv untersucht. Dazu gehören das Vorhandensein struktureller Schäden zu Baseline (Vorhandensein einer Sakroilitis, Existenz von SD), männliches Geschlecht, erhöhte CRP-Konzentrationen und der Raucherstatus zu Baseline [20, 21, 23, 183]. Außerdem kann die Therapie in der untersuchten *Follow-up* Phase von 2 Jahren Einfluss auf die röntgenologische Progression nehmen. Insbesondere eine kontinuierliche Therapie mit NSAR scheint die Progression zu verlangsamen, während dieser Effekt bei Applikation von anti-TNF- α -Inhibitoren über 6 Monate nicht beobachtet werden konnte [184-189].

Somit wurde auch die Therapie der axSpA-Patienten während der *Follow-up* Phase erfasst und der Einfluss als NSAR-Index (Hochdosis NSAR Einnahme > 50 % der Maximaldosis über 2 Jahre) und eine mehr als 6 Monate angewandte anti-TNF- α -Therapie als protektiver Faktor analysiert. Der Einfluss der Risikofaktoren auf die röntgenologische Progression ist in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Berechnung der OR (p-Werte) von Risikofaktoren für die röntgenologische Progression bei axSpA Patienten

Mit Hilfe der binär-logistischen Regression wurde die OR bekannter Risikofaktoren für röntgenologische Progression, definiert als Anstieg des mSASSS um mindestens 2 Punkte oder die Neubildung oder das Wachstum bereits vorhandener Syndesmophyten (SD) innerhalb von 2 Jahren, in unserem Patientenkollektiv berechnet. (*SD BL*- Syndesmophyten zu Baseline, *TNF Inhibitor* – Behandlung für mindestens 6 Monate mit einem anti-TNF α Antikörper über 2 Jahre, *BASDAI* ≥ 4 zu Baseline; *CRP* > 6 mg/l zu Baseline; *NSAR-Index* – Einnahme von mehr als 50 % der täglichen Maximal-Dosis über 2 Jahre)

	Δ mSASSS ≥ 2 Punkte	SD Neubildung/ Wachstum
SD BL	7,4 (0,000)	16,6 (0,000)
TNF Inhibitor	5,7 (0,014)	4,3 (0,052)
Sacroilitis	3,3 (0,015)	6,0 (0,005)
Raucher-Status	2,5 (0,025)	1,8 (0,188)
BASDAI	0,7 (0,350)	1,2 (0,627)
CRP	2,2 (0,057)	2,4 (0,053)
Geschlecht	1,6 (0,270)	2,3 (0,080)
HLA-B27+	1,2 (0,792)	1,7 (0,431)
NSAR-Index	0,6 (0,310)	1,3 (0,611)

Für die mSASSS Progression konnten als Risikofaktoren das Vorhandensein von SD zu Baseline, eine Einnahme von anti-TNF α Inhibitoren über 6 Monate, Rauchen und der

Nachweis einer Sakroilitis ermittelt werden. Die Neubildung oder das Wachstum von SD ist mit dem Vorhandensein von SD und einer Sakroilitis zu Baseline assoziiert (Tab. 18). Die Vorhersagekraft der Biomarker (OR) für die röntgenologische Progression wurde nachfolgend für die signifikanten Parameter adjustiert (Tab. 19).

Tabelle 19: Berechnung des Risikos (OR) für röntgenologische Progression auf Grundlage der ermittelten prädiktiven Werte (cut-off's) ausgewählter Biomarker für axSpA Patienten

Mit Hilfe der binären logistischen Regression wurden die OR's anhand der cut-off's für die radiografische Progression **A)** definiert als mSASSS Anstieg um mindestens 2 Punkte und **B)** definiert als SD Neubildung oder Wachstum nach 2 Jahren für Patienten mit axSpA berechnet. Zusätzlich wurden die OR's für das Vorhandensein von Syndesmophyten zu Baseline, den Nachweis einer Sakroilitis, den Raucherstatus und die Einnahme von anti-TNF α -Blockern für mindestens 6 Monate adjustiert (OR*).

LR – Likelihood Ratio, OR – Odds Ratio, KI – Konfidenzintervall

A) mSASSS Progression

Parameter (cut-off)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	LR ⁺	LR ⁻	OR (95% KI)	OR*, adjustiert (95% KI)
NTX-I (11 nM BCE)	84	43	1.5	0.4	3.9 (1.2 - 12.1) p = 0.020	4.5 (1.1 - 18.3) p = 0,034
BMP-2 (7800 ng/ml)	36	91	4.0	0.7	5.6 (2.0 - 16.0) p = 0.001	4.9 (1.5 - 16.2) p = 0.010
PINP (24 ng/ml)	63	70	2.1	0.5	4.0 (1.7 - 9.5) p = 0.001	3.3 (1.2 - 9.1) p = 0.022
VEGF (700 pg/ml)	33	88	2.8	0.8	3.8 (1.4 - 10.0) p = 0.008	5.9 (1.7 - 20.5) p = 0.006

B) SD Progression

Parameter (cut-off)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	LR ⁺	LR ⁻	OR (95% KI)	OR**, adjustiert (95% KI)
MMP-3 (35 ng/ml)	52	71	1.8	0.7	3.3 (1.3 - 8.3) p = 0.011	4.2 (1.4 - 12.1) p = 0.009
BMP-2 (4000 ng/ml)	96	51	2.0	0.1	22.8 (3.0 - 175.2) p = 0,001	10.2 (1.2 - 83.8) p = 0.031
PINP (28 ng/ml)	57	77	2.5	0.6	4.4 (1.8 - 10.9) p = 0.001	5.3 (1.8 - 15.3) p = 0.002
VEGF (600 pg/ml)	44	83	2.6	0.7	3.1 (1.8 - 10.9) p = 0.031	5.6 (1.5 - 21.3) p = 0.011
LBP (41 μ g/ml)	83	48	1.6	0.4	4.7 (1.3 - 16.8) p = 0.018	2.6 (0.7 - 9.4) p = 0.150

* adjustiert für das Vorhandensein von Syndesmophyten zu BL, anti-TNF α -Therapie für > 6 Monate, Rauchen und Sacroilitis

** adjustiert für das Vorhandensein von Syndesmophyten zu BL und Sacroilitis

Als Biomarker, die ein 4-6-fach erhöhtes Risiko für röntgenologische Progression (mSASSS Anstiegs um mindestens 2 Punkte innerhalb von 2 Jahren) prognostizieren, konnten NTX-I (OR=3,9), BMP-2 (OR=5,6), PINP (OR=4,0) und VEGF (OR=3,8) ermittelt werden. Nach Adjustierung für die ermittelten klinischen Risikofaktoren wies VEGF mit einer OR von 5,9 die höchste Risikobewertung auf (Tab 19A).

Ein 3-23-fach erhöhtes Risiko für SD-Progression, d.h. die Neubildung oder das Wachstum von SD innerhalb von 2 Jahren, zeigten die Biomarker MMP-3 (OR=3,3), BMP-2 (OR=22,8), PINP (OR=4,4), VEGF (OR=3,1) und LBP (OR=4,7) an. LBP ist als Prognosemarker für die SD-Progression nicht geeignet, da die Unterschiede nach der Adjustierung für SD zu Baseline und Sakroilitis nicht mehr signifikant waren. VEGF Konzentrationen > 600 pg/ml hatten die höchste Spezifität und zeigten ein ~ 3-fach (adjustiert ~ 6-fach) erhöhtes Risiko für SD Progression an. BMP-2 Konzentrationen > 4000 ng/ml hatten die höchste Sensitivität und zeigten ein mehr als 20-fach (adjustiert ~ 10-fach) erhöhtes Risiko für eine SD Progression an (Tab. 19B).

SD zu Baseline (Zeitpunkt des Studieneintritts) stellen den größten Risikofaktor für röntgenologische Progression dar [22, 190]. Für die mSASSS Progression betrug die OR für SD zu Baseline 7,4 ($p<0,001$) und für die SD Progression 16,6 ($p<0,001$; Tab. 18). Daher wurden zusätzlich die Patienten mit SD zu BL als Risiko-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne SD zu BL einer gesonderten Analyse unterzogen und die OR anhand der prädiktiven Werte der Biomarker berechnet. Da eine in der Gruppe der Risikopatienten zuvor durchgeführte Regressions-Analyse keinen signifikanten Zusammenhang zu anderen Faktoren ergeben hatte, wurde keine Adjustierung für die ORs vorgenommen.

Bei Risiko-Patienten, die schon zu Baseline Syndesmophyten hatten, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für röntgenologische Progression, definiert als mSASSS Anstieg, für BMP-2 von 4,9 auf 6,8; für PINP von 3,3 auf 5,9 und für VEGF von 5,9 auf 75,9 (Tab. 20A).

Die Wahrscheinlichkeit für die Neubildung oder das Wachstum von SD erhöht sich bei Risiko-Patienten für PINP von 5,3 auf 6,1 und für VEGF von 5,6 auf 13,6 (Tab. 20B). Für BMP-2 (SD-Progression), NTX und MMP-3 konnte kein weiterer Anstieg der Wahrscheinlichkeit für röntgenologische Progression ermittelt werden.

Tabelle 20: Berechnung des Risikos (OR) für röntgenologische Progression auf Grundlage der ermittelten prädiktiven Werte (cut-off's) ausgewählter Biomarker für axSpA Patienten mit Syndesmophyten zu Baseline
 Mit Hilfe der binären logistischen Regression wurden OR's anhand der Schwellenwerte (cut-off's) für die röntgenologische Progression A) für den mSASSS Anstieg um mindestens 2 Punkte und B) die Neubildung oder das Wachstum von SD nach 2 Jahren für Risiko-Patienten mit axSpA, die zu Baseline SD hatten, berechnet. *LR* – Likelihood Ratio, *OR* – Odds Ratio, *KI* – Konfidenzintervall

A) mSASSS Progression

Parameter (cut-off)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	LR ⁺	LR ⁻	OR (95% KI)
NTX-I (11 nM BCE)	89	39	1.5	0.3	4.7 (0.9 - 23.4) <i>p</i> = 0.061
BMP-2 (7800 ng/ml)	50	87	3.8	0.6	6.8 (1.8 - 25.4) <i>p</i> = 0.004
PINP (24 ng/ml)	63	70	2.1	0.5	5.9 (1.7 - 20.1) <i>p</i> = 0.005
VEGF (700 pg/ml)	53	100	106.0	0.5	75.9 (3.9 - 1465.5) <i>p</i> = 0.004

B) SD Progression

Parameter (cut-off)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	LR ⁺	LR ⁻	OR (95% KI)
MMP-3 (35 ng/ml)	53	79	2.5	0.6	4.2 (1.3 - 13.7) <i>p</i> = 0.019
BMP-2 (4000 ng/ml)	95	21	1.2	0.2	10.9 (0.6 - 199.2) <i>p</i> = 0,108
PINP (28 ng/ml)	58	82	3.2	0.5	6.1 (1.8 - 20.7) <i>p</i> = 0.004
VEGF (600 pg/ml)	47	94	7.8	0.6	13.6 (2.3 - 78.3) <i>p</i> = 0.004

5.2 Analyse von Translokationsmarkern und Indikatoren systemischer Immunaktivierung

Im Rahmen der bereits gezeigten systemischen Analysen fiel auf, dass die LBP-Konzentrationen im Serum von axSpA Patienten stark erhöht waren. LBP gilt bei Patienten mit Morbus Crohn als Marker für Translokation, ist aber auch ein Akut-Phase-Protein, das auf Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen, z.B. IL-6 oder IL-22 von Hepatozyten gebildet wird.

Ziel der folgenden Untersuchung war es nun, weitere Hinweise für eine mögliche Translokation bei axSpA Patienten zu finden, einerseits um die Pathogenese der axSpA weiter zu klären und andererseits um neue potenzielle Biomarker zu identifizieren. Zusätzlich erfolgten Untersuchungen im Vollblut, die das Ziel hatten, die systemische Immunaktivierung besser zu charakterisieren.

Als Marker für die Translokation untersuchten wir zum einen direkt die Konzentration von LPS, also bakterieller Strukturen und zum anderen die LBP-Konzentrationen. Als potenzielle Induktoren von LBP quantifizierten wir die Konzentrationen von IL-6 und IL-22 im Serum. Die Serum-Konzentrationen von sCD14 wurden bereits in der vorangegangenen Analyse untersucht und hatten keine Unterschiede zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen gezeigt (Tab. 15). Auf einen Nachweis von sCD14 in diesem Patientenkollektiv wurde daher verzichtet.

Für die Charakterisierung der Immunaktivierung untersuchten wir den Phänotyp und die Funktion von Monozyten im Vollblut. Monozyten sind sehr empfindliche Sensoren von bakteriellen Strukturen und entzündlichen Mediatoren. Wir untersuchten hier die spontane und TLR-/ NOD-Ligand getriggerte Zytokinsekretion im Vollblut und zusätzlich die Phagozytosekapazität der Monozyten.

Für die Analyse standen insgesamt 80 Proben, davon 33 Serumproben, die unter sterilen Bedingungen verarbeitet worden waren, für die Quantifizierung der löslichen Proteinen und 47 Vollblutproben für die Untersuchung der Monozyten von Patienten mit axSpA zur Verfügung. Alle Patienten erfüllten die ASAS Kriterien und 51 Patienten (63,8 %) wurden entsprechend der modifizierten New-York-Kriterien als AS-Patienten klassifiziert. Zusätzlich

wurden 32 Proben, 11 für die Quantifizierung der Serumproteine und 21 für die Untersuchung der Monozyten, von gesunden Kontrollen ohne muskuloskelettale Erkrankungen rekrutiert. In Tabelle 21 sind die von den Patienten und Kontrollen erhobenen demografischen und klinischen Parameter zusammengefasst.

Tabelle 21: Charakterisierung der Patienten (axSpA) und Kontrollen (Ko)

Überblick der demografischen und klinischen Parameter der Serum- und Vollblutspender, die für die Analyse von LPS, IL-6 und LBP und die Charakterisierung der Monozyten verwendet wurden. *axSpA* - *axiale Spondyloarthritis*, *BASDAI* - *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score*, *CRP* - *C-reaktives Protein*, *CED* – *chronisch entzündliche Darmerkrankungen*, *DMARD* – *Disease modifying anti-rheumatic drugs*, *Co* – *Kontrollen*

	axSpA (n=80)	Co (n=29)
Alter in Jahren, MW \pm Stabw	42,5 \pm 11,0	34,8 \pm 8,5*
Geschlecht, m/w (% männlich)	49/31 (61,3)	13/16 (44,8)
HLA-B27+, n (%)	69 (86,3)	-
Sacroilitis, n (%)	51 (63,8)	-
Periphere Arthritis, n (%)	3 (3,8)	-
CED, n (%)	1 (1,3)	-
Psoriasis, n (%)	1 (1,3)	-
NSAR Behandlung	41 (51,3)	-
anti-TNF α Behandlung, n (%)	27 (33,8)	-
DMARD Behandlung, n (%)	2 (2,5)	-
BASDAI, MW \pm Stabw	3,6 \pm 2,3	-
CRP [mg/l], MW \pm Stabw	5,4 \pm 7,5	-

* p = 0,0015

Die Versuchsgruppen unterschieden sich in Bezug auf das Alter und die Geschlechtsverteilung. In der Patientengruppe lag das Durchschnittsalter bei 42,5 \pm 11,0 Jahren, während es in der Kontrollgruppe bei 34,8 \pm 8,5 Jahren lag ($p < 0,01$). Bei den axSpA-Patienten war im Vergleich ein höherer Anteil an Männern (61,3 %) vertreten als in der Kontrollgruppe (44,8 %). In der axSpA-Gruppe zeigten drei Patienten zusätzlich eine periphere Arthritis (3,8 %), ein Patient eine CED (1,3 %) und bei einem Patienten lag eine Psoriasis vor (1,3 %). Mehr als die Hälfte der Patienten wurde mit NSAR (51,3 %) behandelt, zwei Patienten erhielten DMARD's und bei rund 1/3 der Patienten wurde eine anti-TNF- α -Therapie angewendet.

5.2.1 Analyse von potenziellen Translokationsmarkern in Serumproben

Die Konzentration von LPS wurde im Serum von 33 axSpA-Patienten und 11 gesunden Kontrollen mit einem LAL-Test quantifiziert. Zusätzlich wurden die Konzentrationen von IL-6, IL-22 und LBP mittels ELISA in diesen Proben quantifiziert.

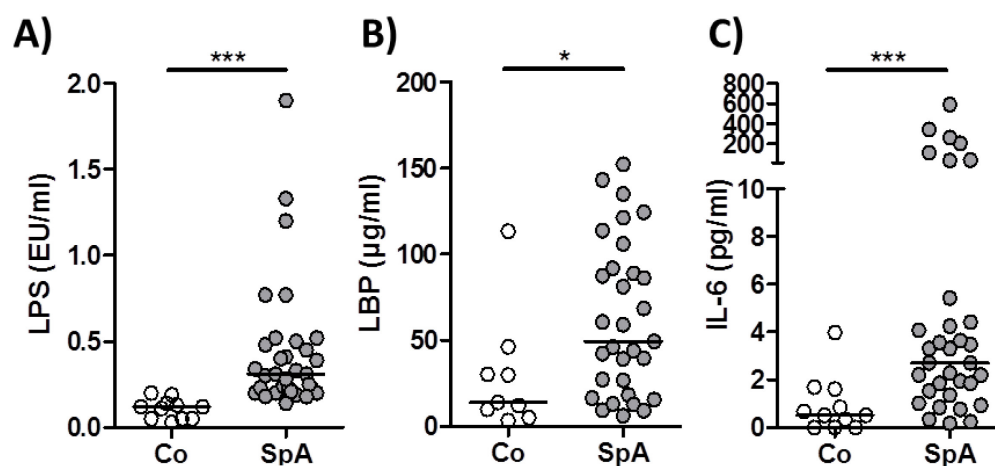


Abbildung 14: Quantifizierung von LPS (LAL-Assay), LBP und IL-6 im Serum (ELISA)

Im Serum von 33 Patienten mit axSpA und 11 Kontrollen wurde mit dem LAL-Kit die LPS-Konzentration ermittelt. Die IL-6 und LBP Konzentrationen wurden mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Einzelwerte als Punkte und der Median als Querbalken (Mann-Whitney U-test). *axSpA* – *axiale Spondyloarthritis*, *Co* – *gesunde Kontrollen*, *EU* – *Endotoxin-Unit*, *LBP* – *LPS bindendes Protein*, *LPS* – *Lipopolysaccharid*

Im Serum von axSpA-Patienten konnten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöhte LPS- (Median: 0,31 vs. 0,12 EU/ml; $p < 0,0001$), LBP- (Median: 49,42 vs. 13,84 µg/ml; $p = 0,0276$) und IL-6-Konzentrationen (Median: 2,71 vs. 0,51 pg/ml; $p = 0,0007$) nachgewiesen werden (Abb 14A-C).

Es wurden keine Unterschiede für die LPS-, LBP- und IL-6 Konzentrationen zwischen Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung, also röntgenologischer Sakroilitis ($n=18$) oder Patienten mit nrSpA ($n=14$) festgestellt ($p > 0,05$).

Die Konzentrationen der analysierten Serum-Proteine unterschieden sich nicht ($p > 0,05$) zwischen Patienten mit Standardtherapie, d.h. Patienten mit kontinuierlicher oder bedarfsweiser Einnahme von NSAR ($n=25$) und Patienten mit anti-TNF- α -Therapie ($n=7$).

Der Nachweis von IL-22 in Serumproben von axSpA-Patienten und Kontrollen war nicht möglich. In einem Vorversuch wurden in vier von sechs Serumproben von Patienten mit Morbus Crohn erhöhte IL-22 Konzentrationen nachgewiesen, während die IL-22 Konzentrationen in Serumproben von axSpA-Patienten ($n=6$) und von Kontrollen ($n=4$) alle unterhalb der Nachweisgrenze lagen (ohne Abb.). Im Gegensatz zu Morbus Crohn scheint IL-22 für die Pathogenese der axSpA nicht relevant zu sein [99].

Um einen Zusammenhang zwischen den analysierten LBP, CRP und IL-6 Konzentrationen mit LPS aufzuzeigen, wurde eine Korrelations-Analyse angefertigt.

Tabelle 22: Korrelationen der Serumparameter CRP, LPS, LBP und IL-6 bei Patienten mit axSpA

Spearman-Korrelation: Korrelationskoeffizient r_s (p-Wert); signifikante Zusammenhänge sind fett gedruckt; axSpA – axiale Spondyloarthritis, LBP – LPS bindendes Protein, LPS – Lipopolysaccharid

rs (p-Wert)	CRP	LPS	LBP
IL-6	0,498 (0,0043)	-0,314 (0,0803)	0,606 (0,0004)
LBP	0,618 (0,0003)	-0,244 (0,1866)	-
LPS	-0,092 (0,6179))	-	-

Die LPS Konzentrationen von axSpA-Patienten korrelierten nicht mit IL-6, CRP oder LBP. Ein linearer Zusammenhang konnte bei axSpA-Patienten zwischen den IL-6- und den CRP-Konzentrationen ($r=0,498$; $p=0,0043$), zwischen den IL-6- und den LBP-Konzentrationen ($r=0,606$; $p=0,0004$) sowie zwischen den LBP- und CRP-Konzentrationen ($r=0,618$; $p=0,0003$) nachgewiesen werden (Tab 22).

Es konnte keine Assoziation zwischen der Krankheitsaktivität (BASDAI) und LPS ($r=0,173$; $p=0,336$) und zwischen dem BASDAI und LBP ($r=0,054$; $p=0,772$), sowie dem BASDAI und IL-6 ($r=0,164$; $p=0,370$) bei axSpA-Patienten festgestellt werden (ohne Abb).

5.2.2 Untersuchungen zum Phänotyp und der Funktion von Monozyten als mögliche Indikatoren systemischer Immunaktivierung

5.2.2.1 Zytokinproduktion nach Antigen-Stimulation im Vollblut

Monozyten sind sehr empfindliche Sensoren für bakterielle Antigene. Die Erkennung dieser antigenen Strukturen durch TLR- oder NOD-Rezeptoren führt innerhalb von 3 - 6 Stunden zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 β und IL-6. Die Synthese des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 beginnt erst 10 - 12 Stunden nach der Erkennung bakterieller Antigene. Auch pro-inflammatorische Zytokine können zur Aktivierung der Monozyten beitragen.

Wir analysierten die spontane Zytokinproduktion und die Reaktivität der Monozyten auf verschiedene bakterielle Antigene. Dazu wurde Vollblut von 34 axSpA-Patienten und 24

gesunden Kontrollen mit den TLR- und NOD-Liganden: PAM (TLR-1/2), FSL (TLR-2/6) LPS (TLR-4) und MDP (NOD-2) für insgesamt fünf Stunden stimuliert. Für die intrazelluläre Zytokinproduktion der CD68⁺ Monozyten wurde die Sekretion von Proteinen durch Zugabe von Brefeldin A für die letzten drei Stunden unterbunden. Ein Ansatz wurde ohne Zugabe eines Antigens inkubiert, um die basale Zytokinproduktion zeigen zu können. IL-10 wurde in Stimulations-Überständen mittels ELISA quantifiziert. Dazu wurde Vollblut 1:2 mit Medium verdünnt und mit den gleichen Stimuli für 18h inkubiert.

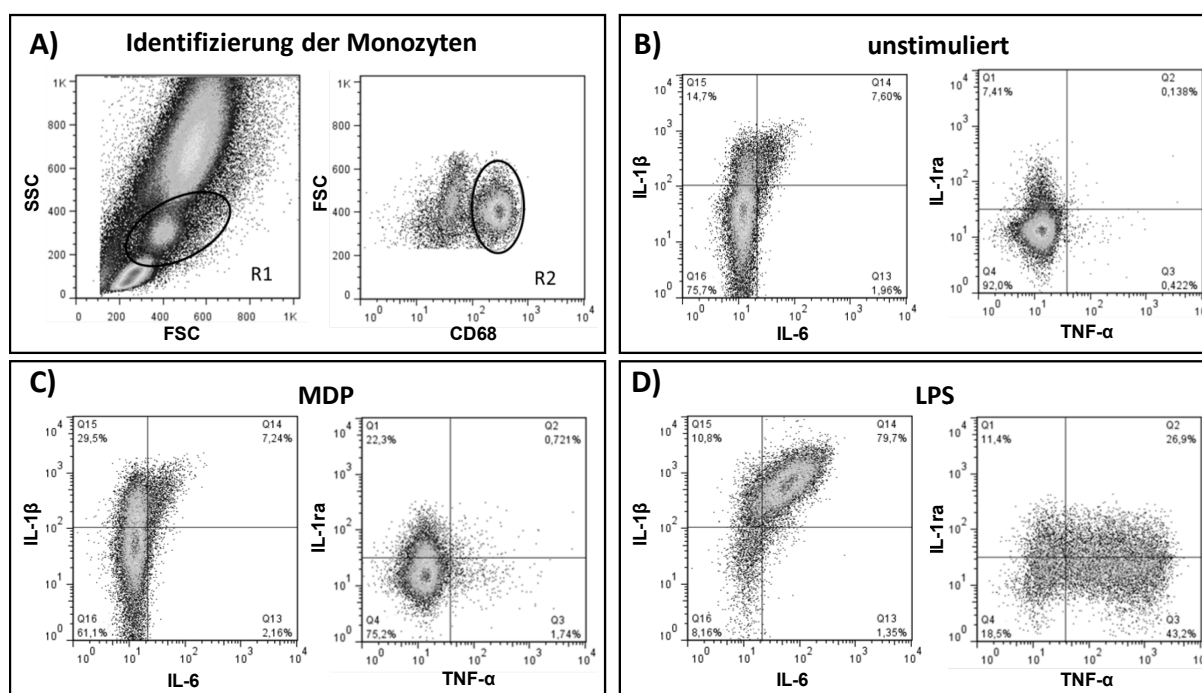


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion CD68⁺ Monozyten im Vollblut

A) Es wurde die Monozytenpopulation anhand ihrer charakteristischen Größe und Granularität im Vorwärts-(FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) markiert (R1) und anhand der intrazellulären Expression von CD68 identifiziert (R2). Die Zytokinproduktion der CD68⁺ Monozyten wurde exemplarisch für einen axSpA-Patienten als Punktdiagramm dargestellt **B)** die spontane **C)** die MDP induzierte und **D)** die LPS induzierte Zytokinantwort. LPS -Llipopolysaccharid (*e.coli*), MDP -Mmuramyldipeptid

Im FSC/SSC Plot wurden die Monozyten anhand ihrer Größe und Granularität und nachfolgend durch die Expression von CD68 identifiziert (Abb 15A). Exemplarisch sind die Frequenzen der spontanen (unstimuliert), der LPS- und der MDP- induzierten Zytokinantwort dargestellt (Abb. 15B-D).

Bei axSpA-Patienten waren in den unstimulierten Ansätzen erhöhte Frequenzen IL-1β⁺, sowie IL-1ra⁺ Monozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (p=0,022 [IL-1β]; p=0,0194 [IL1ra]) nachweisbar (Abb. 16A). Die Stimulation mit PAM (TLR-1/2 Ligand) zeigte keine

signifikanten Unterschiede in der Frequenz zytokin-produzierender Monozyten zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen (Abb 16B). Als Antwort auf die Ligation von TLR-2/6 mit FSL waren erhöhte Frequenzen IL-1 β ⁺ (p=0,037) und TNF- α ⁺ (p=0,021) produzierender CD68⁺ Monozyten bei axSpA-Patienten nachweisbar (Abb. 16C).

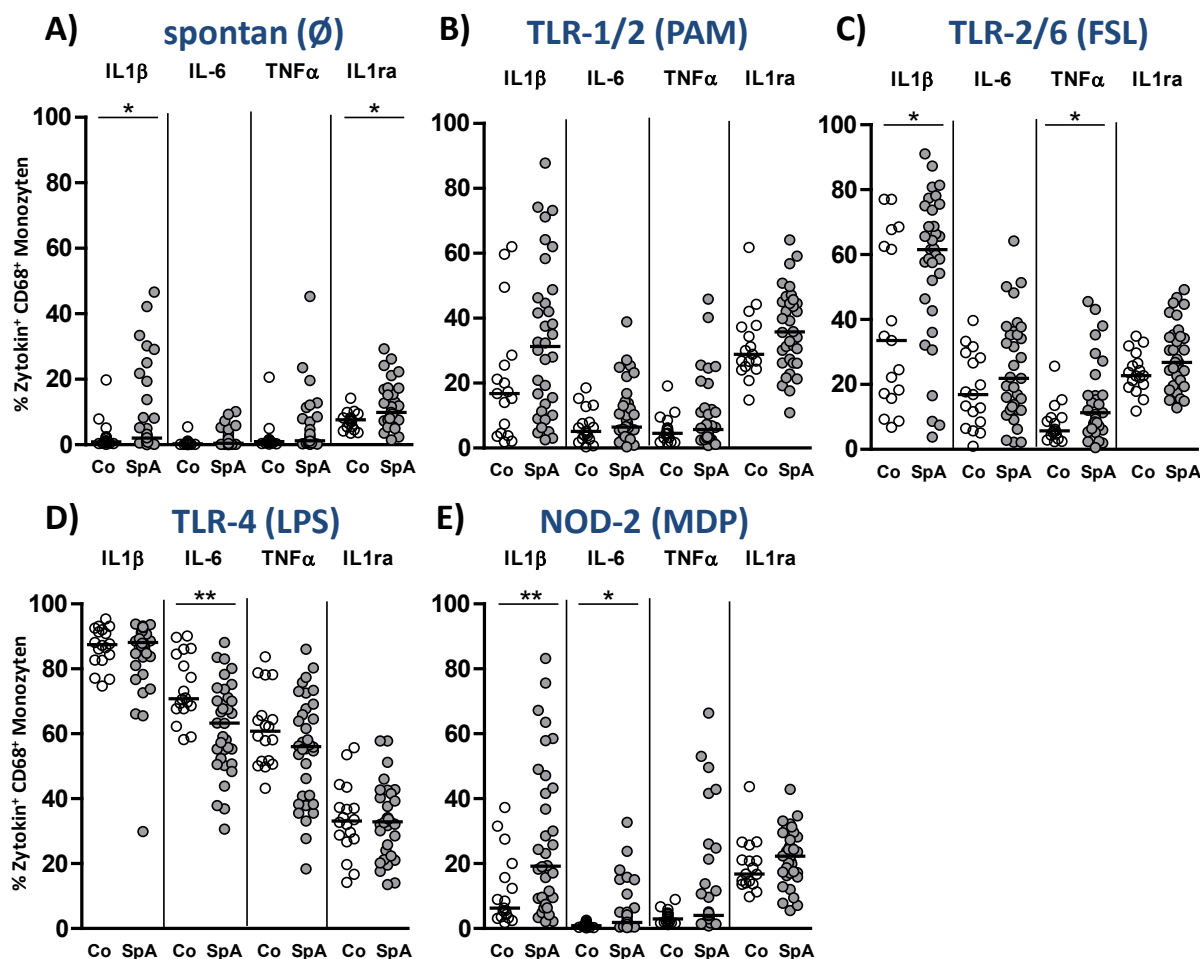


Abbildung 16: Analyse der Zytokinproduktion von CD68⁺ Monozyten im Vollblut

Frisches Heparinblut von gesunden Kontrollen und axSpA-Patienten wurde für insgesamt fünf Stunden mit oder ohne TLR-/ NOD-Ligand stimuliert. Um intrazellulär Zytokine detektieren zu können, wurde die Zytokinsekretion durch die Zugabe von Brefeldin A für die letzten drei Stunden unterbunden. Die Zytokinproduktion der CD68⁺ Monozyten wurde als Punktdiagramm dargestellt und der Prozentsatz bestimmt. Abgebildet sind die Einzelwerte mit dem Median (Querbalken). Für den Mittelwertvergleich zwischen den Gruppen wurde der Mann Whitney-U-Test genutzt (Signifikanzniveau: p<0,05*; p<0,01**); Co - Kontrollen, SpA – Patienten mit axialer Spondyloarthritis; LPS - Lipopolysaccharid, MDP - Muramyl-dipeptid; FSL - Fibroblasten stimulierendes Lipopeptid, PAM - tripalmitoyliertes-Lipopeptid

Auf die Stimulation mit dem TLR-4 Liganden LPS zeigten die axSpA-Patienten eine verminderte Frequenz IL-6⁺ Monozyten (p=0,003) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb. 16D). Eine Stimulation mit dem NOD-2 Liganden MDP resultierte in erhöhten Frequenzen IL-1 β - (p=0,007) und IL-6- (p=0,019) produzierender Monozyten bei axSpA-Patienten (Abb. 16E).

In Abbildung 17 sind die IL-10-Konzentrationen in den Stimulationsüberständen als Einzelwerte dargestellt. Nach Exposition mit LPS zeigten axSpA-Patienten verminderte IL-10 Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Weder für die spontane Sekretion von IL-10, noch für die Stimulation mit MDP, FSL und PAM konnten Unterschiede in der IL-10-Produktion zwischen axSpA-Patienten und gesunden Kontrollen nachgewiesen werden.

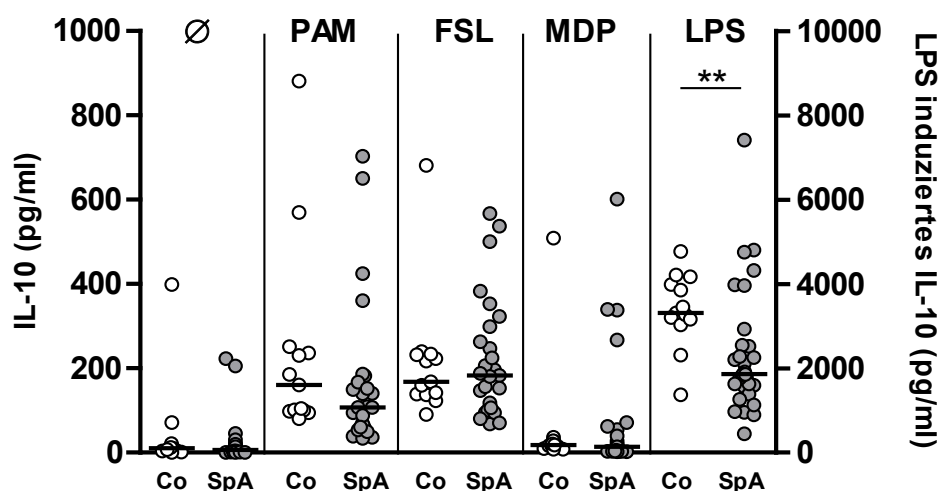


Abbildung 17: Quantifizierung von IL-10 in Überständen stimulierter Vollblut Proben

Vollblutproben von gesunden Kontrollen und axSpA-Patienten wurden 1:2 mit Medium verdünnt und für 18 Stunden mit LPS, MDP, FSL, PAM oder nur mit Medium (Ø) stimuliert. IL-10 wurde mittels ELISA in den Stimulationsüberständen quantifiziert. Für den Mittelwertvergleich zwischen den Gruppen wurde der Mann Whitney-U-Test genutzt (Signifikanzniveau: $p < 0,01^{**}$).

Co - Kontrollen, SpA – Patienten mit axialer Spondyloarthritis; LPS - Lipopolysaccharid, MDP - Muramylidipeptid; FSL - Fibroblasten stimulierendes Lipopeptid, PAM - tripalmitoyliertes-Lipopeptid

Als Nächstes wurde eine univariate Varianzanalyse durchgeführt um einen Einfluss von klinischen oder demografischen Parametern auf die Zytokinproduktion nachzuweisen. Da für die Stimulation mit dem TLR-1/2 Agonisten PAM keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar waren, wurde auf die univariate Varianzanalyse für PAM-induzierte Zytokine verzichtet.

Ausschließlich für die LPS-induzierte IL-1ra Produktion konnte ein Zusammenhang zum Alter dargestellt werden. Ein Einfluss des Geschlechts konnte für die spontane IL-1 β , TNF- α und IL-1ra Produktion sowie die TNF- α Produktion nach MDP Stimulation gezeigt werden. Die Therapieform, d.h. eine Therapie mit Biologika gegenüber der Standardtherapie, hatte einen Einfluss auf die spontane Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α sowie die FSL induzierte IL-6-Produktion (Abb.20).

Tabelle 23: Einfluss klinischer und demografischer Parameter auf die Zytokinproduktion der Monozyten

Mit Hilfe der univariaten Varianzanalyse wurde der Einfluss kategorialer Parameter (Geschlecht, Therapie und Sakroilitis) auf die spontane und Antigen-induzierte Zytokinproduktion überprüft. Für den Einfluss von stetigen Parametern (Alter, CRP-Wert und BASDAI) auf die Zytokinproduktion wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Dargestellt sind die p-Werte der Mittelwertunterschiede; signifikante Unterschiede sind fett gedruckt.

Stimulus	Zytokin	Alter	Geschlecht	Therapie	Sacroilitis	CRP	BASDAI
Ø	IL-1	0,304	0,013	0,014	0,437	0,029	0,090
	IL-6	0,421	0,204	0,046	0,144	0,078	0,080
	TNFα	0,504	0,013	0,019	0,388	0,083	0,129
	IL-1ra	0,961	0,002	0,924	0,405	0,059	0,570
	IL-10	0,057	0,258	0,750	0,420	0,556	0,340
LPS	IL-1	0,645	0,751	0,719	0,449	0,834	0,057
	IL-6	0,358	0,437	0,901	0,934	0,418	0,150
	TNFα	0,289	0,972	0,968	0,868	0,178	0,030
	IL-1ra	0,021	0,729	0,621	0,401	0,240	0,259
	IL-10	0,902	0,665	0,978	0,442	0,967	0,176
MDP	IL-1	0,682	0,293	0,189	0,696	0,018	0,016
	IL-6	0,688	0,159	0,143	0,508	0,054	0,051
	TNFα	0,646	0,045	0,132	0,947	0,084	0,076
	IL-1ra	0,611	0,455	0,091	0,452	0,076	0,045
	IL-10	0,753	0,275	0,963	0,408	0,217	0,237
FSL	IL-1	0,615	0,345	0,242	0,774	0,378	0,479
	IL-6	0,266	0,337	0,009	0,434	0,390	0,464
	TNFα	0,704	0,219	0,459	0,565	0,435	0,444
	IL-1ra	0,371	0,882	0,966	0,450	0,842	0,524
	IL-10	0,917	0,129	0,690	0,553	0,005	0,192

Für das Vorhandensein einer Sakroilitis konnte kein Einfluss auf die Zytokinproduktion nachgewiesen werden. Der CRP-Wert war mit IL-1 β sowohl spontan als auch nach MDP Stimulation und mit der IL-10 Antwort auf FSL-Stimulation assoziiert. Der BASDAI war mit der MDP-induzierten IL-1 β und IL-1ra Produktion assoziiert (Tab. 23).

Da sich die untersuchten Gruppen teilweise in der Geschlechtsverteilung und im Alter unterschieden und die univariate Analyse eine Assoziation mit diesen Faktoren gezeigt hatte, wurde die Varianzanalyse der Stimulationsversuche für das Geschlecht und das Alter adjustiert. Da die Messwerte nicht normal verteilt vorlagen, wurden sie in logarithmierter Form analysiert (Tab. 24)

Tabelle 24: Adjustierung der Analyse der spontanen und induzierten Zytokinproduktion der Monozyten

Die Parameter Alter und Geschlecht konnten in den Versuchsgruppen nicht experimentell kontrolliert werden. Daher wurden die Mittelwertunterschiede von axSpA Patienten und Kontrollen für das Alter und das Geschlecht adjustiert (signifikante Unterschiede sind fett gedruckt).

Zytokin	Ø		LPS		MDP		FSL	
	p-value	p-value *	p-value	p-value *	p-value	p-value *	p-value	p-value *
IL-1β	0.016	0.032	0.420	0.281	0.002	0.005	0.017	0.035
IL-6	0.034	0.053	0.002	0.002	0.005	0.015	0.271	0.297
TNF-α	0.090	0.173	0.068	0.059	0.037	0.055	0.072	0.091
IL-1ra	0.026	0.074	0.933	0.903	0.241	0.632	0.030	0.116
IL-10	0.238	0.231	0.025	0.029	0.322	0.444	0.468	0.628

* adjustiert für Geschlecht und Alter

Nach der Adjustierung für Geschlecht und Alter waren die spontane IL-1β (p=0,032), die LPS induzierte IL-6 (p=0,002) und IL-10 (p=0,029) Produktion, die MDP induzierte IL-1β (p=0,005) und IL-6 (p=0,015) Produktion und die FSL-induzierte IL-1β (p=0,035) Produktion signifikant unterschiedlich zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen (Tab. 24).

Daneben hatte die univariate Analyse gezeigt, dass die Behandlung einen Einfluss auf die Zytokinproduktion der Monozyten im Vollblut mit und ohne Antigenexposition hatte. Es erfolgte eine Subanalyse der Daten in Abhängigkeit von der Therapie der Patienten. Dazu wurden die axSpA-Patienten entsprechend ihrer Therapie in Patienten mit Standard-Therapie (kontinuierliche oder bedarfsweise NSAR-Einnahme) und Patienten mit Biologika-Therapie eingeteilt (Abb. 21).

Nur Patienten mit Standard-Therapie zeigten eine Erhöhung der spontan IL-1β⁺ und TNF-α⁺ produzierenden Monozyten im Vergleich zu Patienten mit Biologika-Therapie. Die Frequenz an IL-6⁺ Monozyten war wie die IL-10 Produktion nach LPS Stimulation unabhängig von der Therapie in beiden Patientengruppen vermindert. Nach Stimulation mit MDP waren nur die Frequenzen der IL-1β⁺ und TNF-α⁺ Monozyten bei axSpA-Patienten mit Standard-Therapie gegenüber den Kontrollen erhöht. Als Antwort auf eine Stimulation mit FSL konnten erhöhte Frequenzen IL-1β produzierender Monozyten bei Patienten mit Standard-Therapie im Vergleich zu Patienten mit Biologika-Therapie und für TNF-α im Vergleich zu Kontrollen dargestellt werden (Abb. 18).

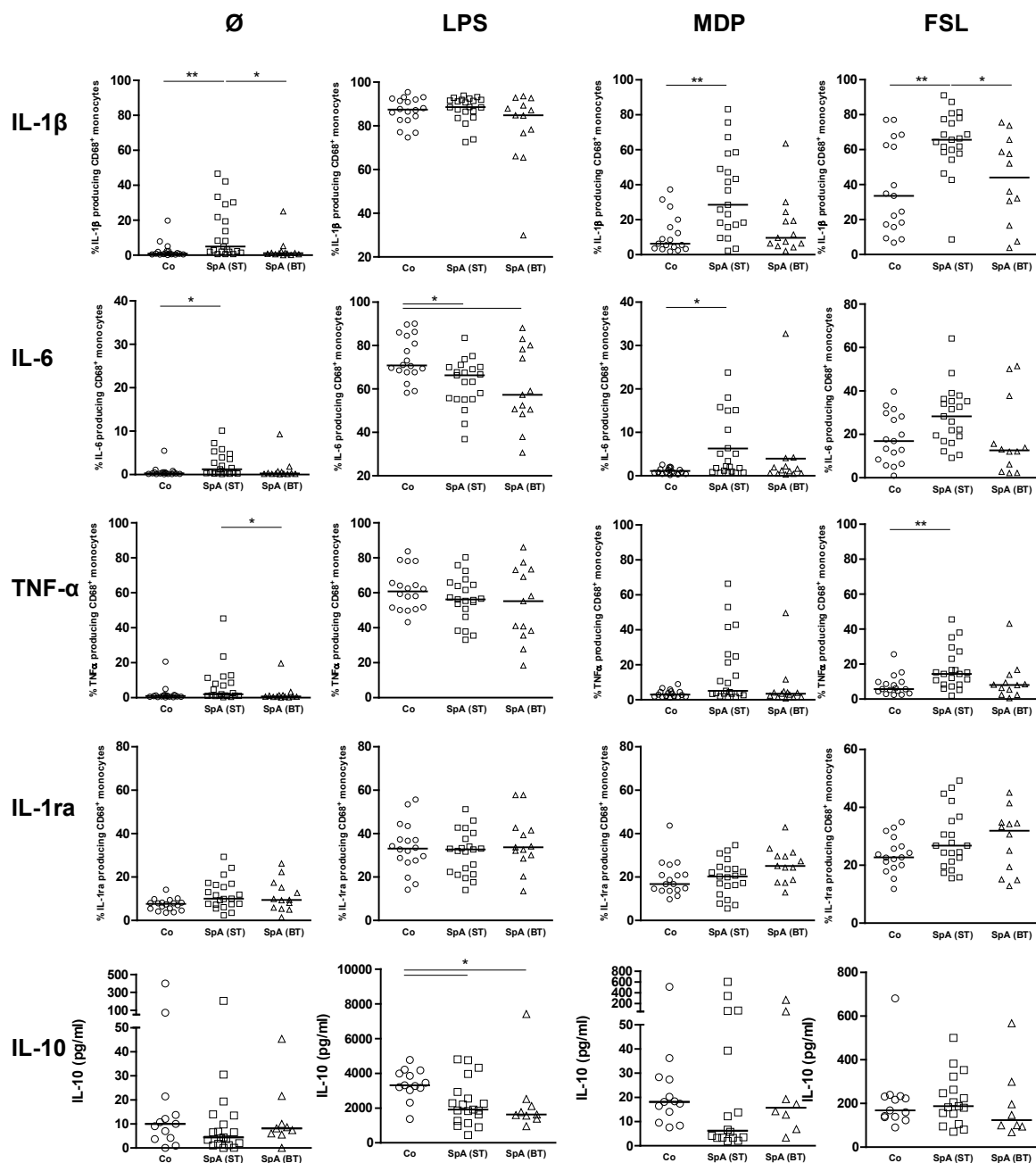


Abbildung 18: Einfluss der Behandlung auf die Zytokinproduktion von Monozyten im Vollblut

Subanalyse der Frequenzen $1\beta^+$, $IL-6^+$, $TNF-\alpha^+$ und $IL-1ra^+$ Monozyten nach 5 Stunden sowie der IL-10 Produktion nach 18 Stunden mit und ohne Antigenstimulation in axSpA-Patienten mit Standard-Therapie SpA (ST) und mit Biologika-Therapie SpA (BT). Die Gruppenunterschiede wurden mit Hilfe des *Kruskal-Wallis-Test* mit angeschlossenen *Dunn's multiplen post test* verifiziert, p-Werte < 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Aufgrund der Tatsache, dass nur Patienten mit Standard-Therapie erhöhte spontane und MDP/ FSL induzierte bzw. verminderte LPS induzierte Frequenzen zytokinproduzierender $CD68^+$ Monozyten aufwiesen, wurde die univariate Varianzanalyse für Patienten mit Standard-Therapie wiederholt durchgeführt (Tab. 25).

Tabelle 25: Einfluss klinischer und demografischer Parameter auf die Zytokinproduktion der Monozyten von axSpA-Patienten mit Standard-Therapie (kontinuierliche oder bedarfsweise Einnahme von NSAR)

Mit Hilfe der univariaten Varianzanalyse wurde der Einfluss kategorialer Parameter (Geschlecht und Sakroilitis) auf die spontane und Antigen-induzierte Zytokinproduktion überprüft. Für den Einfluss von stetigen Parametern (Alter, CRP-Werte und BASDAI) auf die Zytokinproduktion wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Dargestellt sind die p-Werte der Mittelwertunterschiede; signifikante Unterschiede sind fett gedruckt.

Stimulus	Zytokin	Alter	Geschlecht	Sakroilitis	CRP	BASDAI
Ø	IL-1	0,676	0,083	0.980	0.539	0.011
	IL-6	0,616	0,182	0.604	0.829	0.025
	TNFa	0,842	0,091	0.856	0.984	0.006
	IL-1ra	0,909	0,264	0.299	0.449	0.181
	IL-10	0,139	0,578	0.488	0.584	0.318
LPS	IL-1	0,576	0,498	0.300	0.126	0.040
	IL-6	0,732	0,148	0.693	0.698	0.034
	TNFa	0,804	0,663	0.439	0.963	0.007
	IL-1ra	0,483	0,225	0.098	0.433	0.010
	IL-10	0,103	0,827	0.634	0.812	0.177
MDP	IL-1	0,473	0,031	0.888	0.584	0.005
	IL-6	0,859	0,115	0.546	0.625	0.029
	TNFa	0,433	0,178	0.692	0.516	0.001
	IL-1ra	0,672	0,346	0.543	0.744	0.048
	IL-10	0,290	0,623	0.691	0.742	0.010
FSL	IL-1	0,884	0,502	0.492	0.470	0.642
	IL-6	0,649	0,859	0.389	0.483	0.669
	TNFa	0,609	0,926	0.861	0.918	0.669
	IL-1ra	0,429	0,857	0.227	0.390	0.040
	IL-10	0,033	0,935	0.714	0.199	0.037

Bei Patienten mit Standard-Therapie gibt es eine Assoziation zwischen dem BASDAI und der Frequenz Zytokin-produzierender Monozyten für die spontane Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine und für alle LPS-induzierten Zytokine außer IL-10, für alle MDP induzierten Zytokine und alle FSL-induzierten anti-inflammatorischen Zytokine. Der CRP Wert oder das Stadium der Erkrankung (Vorhandensein einer röntgenologischen Sakroilitis) waren bei Patienten mit Standard-Therapie nicht mit der Produktion von Zytokinen assoziiert (Tab. 25).

5.2.2.2 Phänotypische Analyse von Monozyten

Die Ergebnisse der Vollblutstimulation deuten auf eine Prä-aktivierung der Monozyten *in vivo* bei axSpA-Patienten hin. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine verminderte Aktivierbarkeit der Monozyten durch LPS bei diesen Patienten. Um zu klären, ob der veränderten Aktivierbarkeit Unterschiede in der Expression von Rezeptoren oder Verschiebungen in den Monozyten-Subpopulationen bei axSpA-Patienten zugrunde liegen, erfolgte eine

phänotypische Charakterisierung der Monozyten. Von besonderem Interesse war die Expression der Oberflächenmoleküle CD14 und TLR-4, da beide für die Bindung von LPS notwendig sind. Darüber hinaus wurden weitere Rezeptoren auf der Oberfläche der Monozyten, die für die Erkennung und Präsentation von bakteriellen Antigenen bedeutsam sind, mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper im Durchflusszytometer analysiert.

Zusätzlich zu der Expression von CD14 und TLR-4 wurde auch die Expression von TLR-1 und TLR-2 sowie des MHC-Klasse II Rezeptors HLA-DR, der Fcγ Rezeptoren CD16 und CD64, des co-stimulatorischen Moleküls CD80, des M-CSF-Rezeptors CD115 und des Scavenger Rezeptors CD163 untersucht.

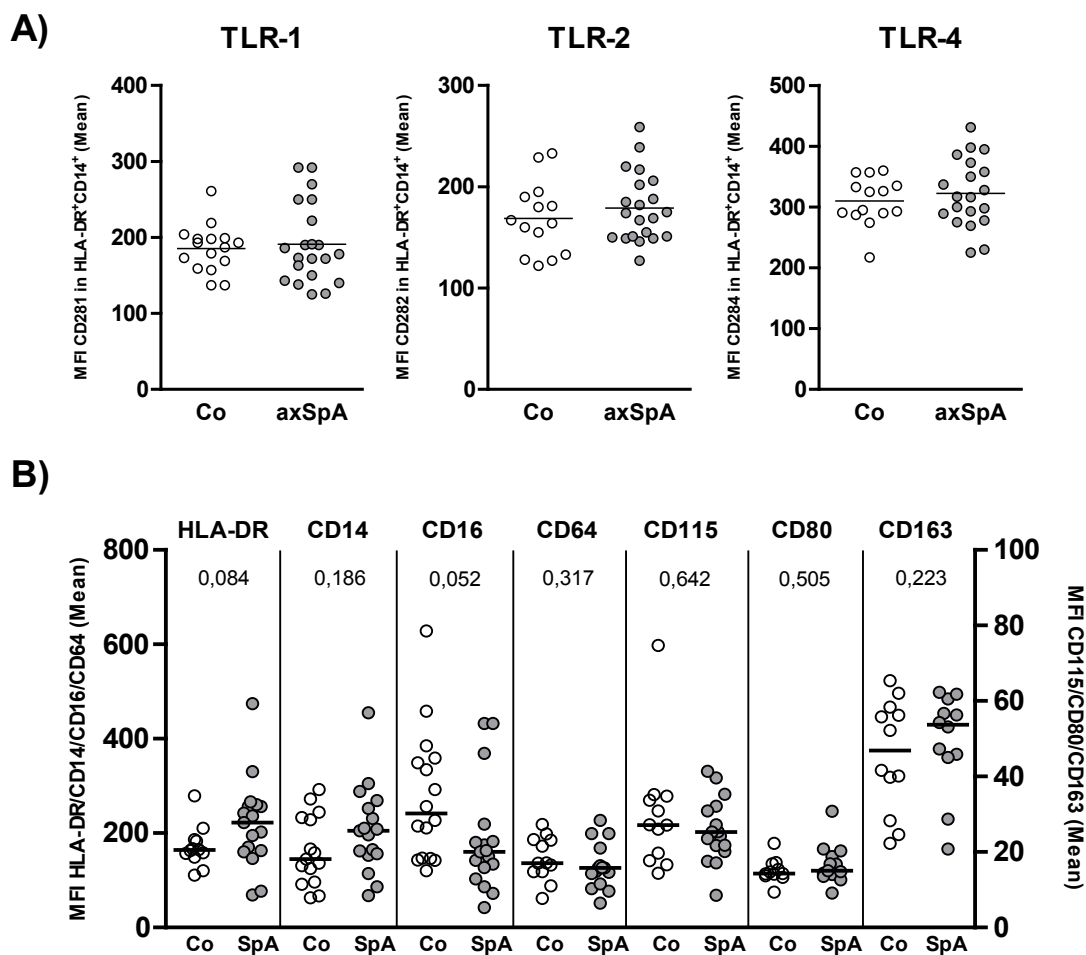


Abbildung 19: Phänotypische Analyse der Monozyten im Vollblut von axSpA-Patienten und Kontrollen

Peripheres Blut von axSpA-Patienten und gesunden Kontrollen wurde auf die Expression der Oberflächenmarker **A)** CD281 (TLR-1), CD282 (TLR-2) und CD284 (TLR-4) und **B)** von HLA-DR, CD14, CD16, CD64, CD80, CD115 und CD163 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind die Einzelergebnisse mit dem Median und p-Werte des Mann Whitney-U-Tests. Die MFI von TLR-1, TLR-2, TLR-4 wurde für CD14⁺HLA-DR⁺ Monozyten, die MFI von CD14 und CD16 für Monozyten und die MFI der anderen Oberflächen-Marker für CD14⁺ Monozyten ermittelt. MFI -mittlere Fluoreszenzintensität

Die phänotypische Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen. Für die Expression von HLA-DR konnte ein Trend für eine erhöhte Expression und für CD16 eine verringerte Expression bei axSpA Patienten gefunden werden, dem aber die statistische Signifikanz fehlte (Abb. 19).

5.2.2.3 Untersuchung der Verteilung der Monozyten-Subpopulationen

Anhand der Expression des LPS-Rezeptors CD14 und des Fcγ-Rezeptors CD16 können drei funktionell verschiedene Populationen innerhalb der Monozyten unterschieden werden. Für die Analyse der Monozyten-Subpopulationen im peripheren Blut wurden fluoreszenzmarkierte Antikörpern gegen CD14, CD16 und HLA-DR verwendet und im Durchflusszytometer analysiert. Für diesen Versuch standen Vollblutproben von 30 axSpA-Patienten und 12 Kontrollen zur Verfügung.

Die Monozytenpopulation wurde anhand ihrer charakteristischen Größe und Granularität im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) markiert und mittels der Expression von HLA-DR von den Granulozyten abgegrenzt (Abb. 20A).

Bei axSpA-Patienten konnte eine mittlere Frequenz (Median [25-75% Perzentile]) an klassischen $CD14^+CD16^-$ Monozyten von 84,9 % [76,3-87,1] nachgewiesen werden, während die Kontrollgruppe nur durchschnittlich 76,4 % [73,8-79,9] $CD14^+CD16^-$ Monozyten aufwies ($p=0,049$). Die Frequenz der intermediären $CD14^{++}CD16^+$ Monozyten war vermindert (4,1 % [2,7-6,1] bei axSpA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (6,9 % [5,5-9,5]; $p=0,004$). Tendenziell waren auch die nicht-klassischen $CD14^+CD16^+$ Monozyten bei axSpA-Patienten (3,1 % [2,0-6,0]) vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe (5,9 % [3,6-8,2]; $p=0,073$); die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 20B).

Die Verminderung der $CD14^{++}CD16^+$ (3,7 % [2,7-5,7] vs. 6,9 % [5,5-9,5]; $p=0,002$) und die damit einhergehende Erhöhung der $CD14^{++}CD16^-$ (83,2 % [77,8-86,7] vs. 76,4 % [73,8-79,9]; $p=0,035$) Monozyten ist bei Patienten, die mit Standard-Therapie behandelt wurden, ausgeprägter im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die Therapie mit einem anti-TNF- α Blocker scheint demnach einen Einfluss auf die Expression von CD16 zu haben (Abb. 20C).

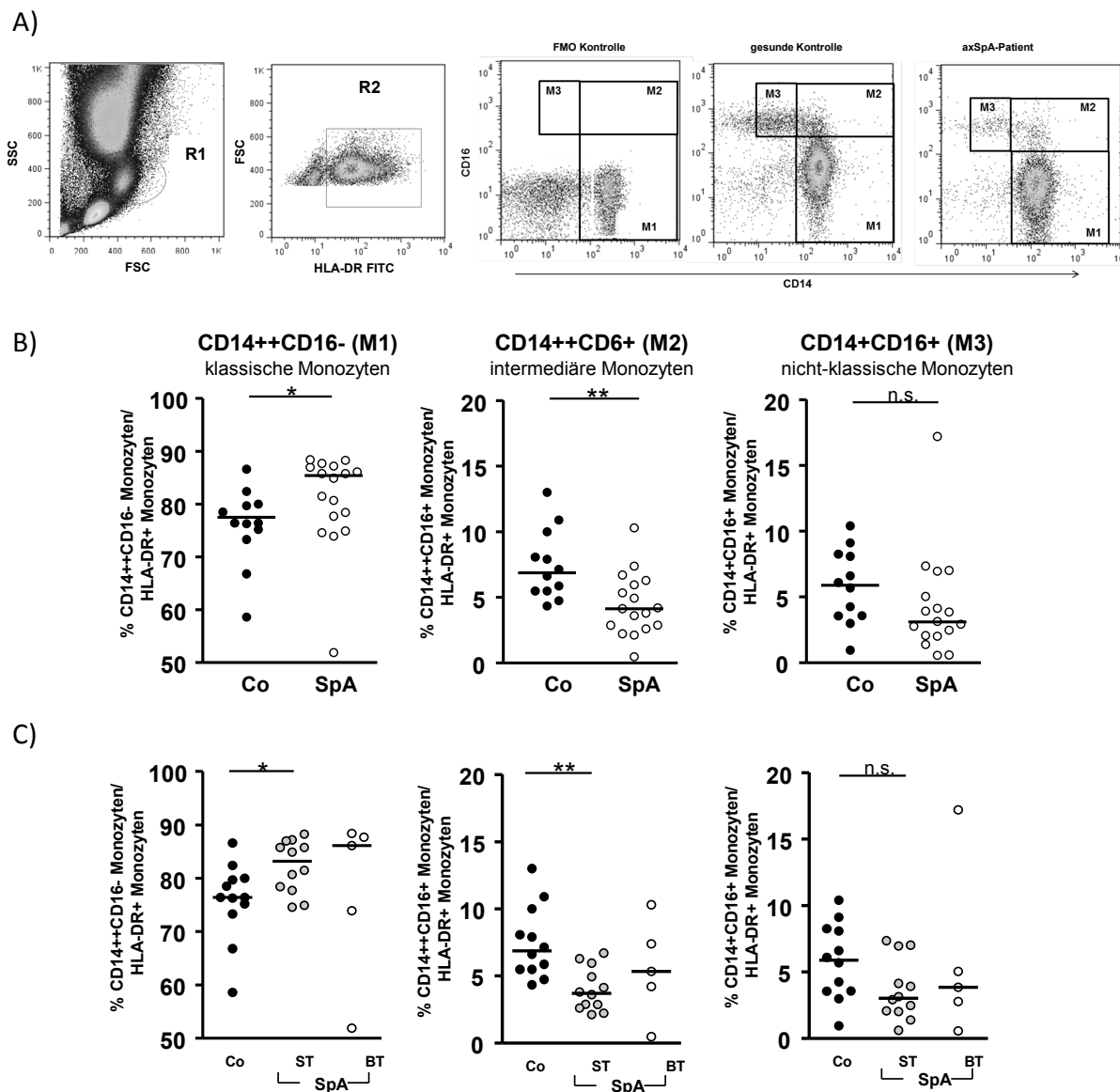


Abbildung 20: Analyse der Monozyten-Subpopulationen anhand der CD14 und CD16 Expression

Die Monozytenpopulation wurde anhand ihrer charakteristischen Größe und Granularität im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) markiert und durch die Expression von HLA-DR von den Granulozyten abgegrenzt. Die Monozyten werden basierend auf der Expression von CD14 und CD16 in die Subpopulationen M1 (CD14⁺⁺CD16⁻), M2 (CD14⁺⁺CD16⁺) und M3 (CD14⁺CD16⁺) unterteilt **A)**. Abgebildet sind die Frequenzen der Subpopulationen als Einzelergebnisse mit dem Median für axSpA-Patienten und Kontrollen **B)** und unterteilt nach der Therapie **C)**. Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$ wird als signifikant angesehen.

5.2.2.4 Untersuchung der Phagozytosekapazität der Monozyten

Eine weitere wesentliche Funktion von Monozyten, neben der Zytokinproduktion, stellt die Phagozytose eingedrungener Mikroorganismen sowie geschädigter oder gealterter Zellen dar. Es sollte nun überprüft werden, ob die Phagozytoseleistung von Monozyten bei axSpA-Patienten verändert ist. Dazu wurde ein Phagozytostest mit pHrodo gekoppelten E-coli-Partikeln im Vollblut von axSpA-Patienten und Kontrollen durchgeführt.

Vollblut von 20 axSpA-Patienten und 12 Kontrollen wurde mit pHrodo gekoppelten E-coli Partikeln inkubiert. Die Aufnahme der Partikel wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Die Monozyten wurden anhand der Expression von CD14 identifiziert. Die Phagozytoseleistung konnte durch die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) von pHrodo quantifiziert werden. Die Einzelwerte sind als Mittelwerte (*Mean*) der MFI von pHrodo bei 37° C abzüglich der unspezifischen Fluoreszenz bei 4° C dargestellt (Abb. 21A).

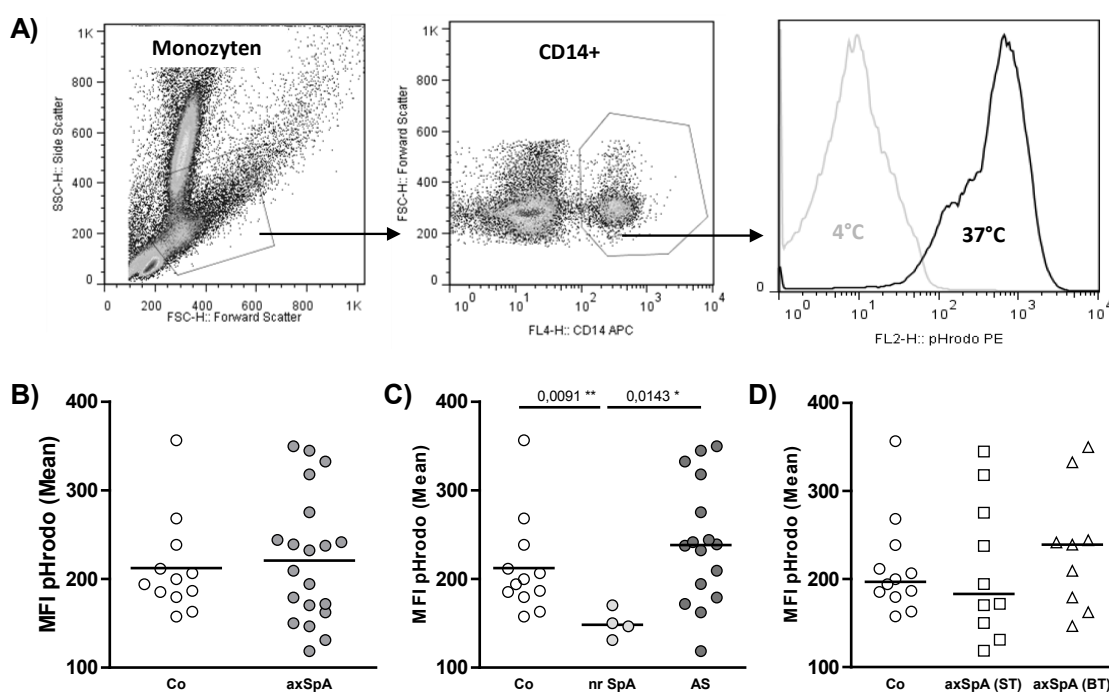


Abbildung 21: Phagozytose von pHrodo-gekoppelten E.-coli Partikeln von CD14⁺ Monozyten im Vollblut

Vollblut von axSpA-Patienten und gesunden Kontrollen wurde mit pHrodo-gekoppelten e-coli Partikeln für 15 min jeweils bei 4° C und 37° C inkubiert. Zur Identifikation der Monozyten wurde ein Antikörper gegen CD14 verwendet. Die Aufnahme der Partikel wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert und anhand der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von pHrodo quantifiziert. **A).** Die Einzelwerte sind als *Mean* der MFI von pHrodo bei 37° C abzüglich der unspezifischen Fluoreszenz bei 4° C für axSpA-Patienten und Kontrollen dargestellt **B)** unterteilt nach Patienten ohne (nrSpA) und mit (AS) röntgenologisch nachweisbarer Sakroilitis **C)** sowie unterteilt nach der Behandlung mit Standard- oder Biologika-Therapie **D).** Die Balken kennzeichnen den Median; Mann-Whitney U-Test (B); Kruskal-Wallis-Test + Dunn's Post-Test (C+D); p-Werte < 0,05 werden als signifikant angesehen

Es konnten keine Unterschiede in der Phagozytoseleistung zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen festgestellt werden (Abb.21B). Die Subanalyse, basierend auf den Krankheitsstadien, zeigte eine verminderte Phagozytoseleistung der Monozyten bei Patienten mit nicht-röntgenologischer SpA (nrSpA) im Vergleich zu Patienten mit röntgenologischer SpA (AS) und zu Kontrollen (Abb.21 C). Diese Daten müssen jedoch aufgrund der kleinen Gruppengröße bei den nrSpA-Patienten (n=4) als präliminär gelten.

Die Therapie hatte bei den untersuchten Patienten keinen Einfluss auf die Phagozytoseleistung, da sich Patienten unter Standard-Therapie weder signifikant von Patienten unter Biologika-Therapie unterschieden noch im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb 21D).

6 Diskussion

6.1 Diagnostische Bedeutung der analysierten Biomarker

Seit vielen Jahren ist die rheumatologische Forschung auf die Identifikation klinisch relevanter Biomarker ausgerichtet. Die Untersuchungen konzentrieren sich dabei auf Biomarker, die die Diagnosestellung erleichtern (diagnostische Biomarker) und anhand derer der Krankheitsverlauf (prognostische Biomarker) oder der Behandlungserfolg (prädiktive Biomarker) vorausgesagt werden kann. Für die Diagnosestellung einer Rheumatoiden Arthritis fanden beispielsweise die anti-CCP-Antikörper (Antikörper gegen citrullinierte Proteine) Eingang in die klinische Praxis [191].

Für die axSpA gibt es bisher wenige serologische Parameter mit hoher Sensitivität und vor allem Spezifität. Der Nachweis von HLA-B27 wird u.a. gegenwärtig gemäß den ASAS-Kriterien von 2009 für die Diagnose der axSpA genutzt. Der HLA-B27 Nachweis zeigte durchschnittlich eine Sensitivität von 83-96 % sowie eine Spezifität von 90-96 % bei Patienten mit axialer Beteiligung und hatte damit eine LR^+ von 9,0 [192]. Hierbei ist zu bemerken, dass HLA-B27 lediglich eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für axSpA nachweist. Im Einzelfall müssen daher andere Parameter für die Diagnosestellung herangezogen werden. Den gebräuchlichsten Entzündungsparametern BSG und CRP fehlen jedoch die nötige Aussagekraft, da nur bei 40-60 % der SpA-Patienten erhöhte CRP- und BSG-Konzentrationen nachweisbar sind [1-3]. Erhöhte Entzündungsparameter wie das CRP zeigten in vorangegangenen Studien eine mittlere Spezifität von 67-80 % sowie eine Sensitivität von 38-69 % und wiesen damit eine LR^+ von 2,5 auf [193].

Bislang ist die Ursache der Entzündung nicht bekannt; als ein möglicher Trigger wird jedoch die Translokation von Antigenen aus dem Darm bei Patienten mit axSpA diskutiert [40, 194]. Außerdem stellen Knochen- und Knorpelumbau wesentliche Kennzeichen der axSpA dar.

Wir analysierten daher im Rahmen dieser Arbeit die Serumkonzentrationen von Entzündungsparametern wie VEGF, von Translokationsmarkern wie LBP, sCD14 und LPS und von spezifischen Parametern des Knorpel- und Knochenmetabolismus. Um die diagnostische Potenz dieser Marker zu bestimmen, verglichen wir die Serumkonzentration dieser Proteine in Patienten mit axSpA mit denen einer gesunden Vergleichspopulation ohne muskuloskelettale Erkrankungen.

Wir fanden signifikant höhere Serumkonzentrationen der Knorpel- und Knochenabbaumarker CTX-II und sRANKL, der Knorpel- und Knochenaufbaumarker BMP-2 und OPG und des Entzündungs- und Translokationsmarkers LBP in Patienten mit axSpA im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Tab. 15).

Der Nachweis erhöhter CTX-II Serumkonzentrationen bei axSpA-Patienten steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Studien an AS-Patienten [195-199]. Unsere Analyse wies dabei für CTX-II-Serumkonzentrationen über einem cut-off-Wert von 0,45 ng/ml eine hohe diagnostische Evidenz mit einer LR^+ von 5,1 auf (Tab. 16). Erhöhte CTX-II-Konzentrationen diskriminieren axSpA-Patienten von Gesunden mit einer Spezifität von 85 % und einer Sensitivität von 77 %. Daher ist CTX-II als potenzieller Biomarker für die Diagnosestellung der axSpA geeignet. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die diagnostische Eignung anhand einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt wurde. Auch bei Patienten mit anderen muskuloskelettalen Gelenkerkrankungen, wie Osteoarthritis oder bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis wurden erhöhte CTX-II-Serum-Konzentrationen nachgewiesen [200, 201].

Bezüglich der Analyse von Serumkonzentrationen des Osteoklasten-aktivierenden sRANKL und des Osteoklasten-inhibierenden OPG gibt es widersprüchliche Daten bei AS-Patienten. In einigen Studien wurden erhöhte OPG-Konzentrationen beschrieben [202-204] während andere Arbeitsgruppen über normale [205] bzw. verminderte OPG-Konzentrationen bei AS-Patienten berichten [206, 207]. Ebenso wurden sowohl normale [207] als auch erhöhte [202] sRANKL-Konzentrationen bei AS-Patienten beschrieben. Da bei Probanden unter 50 Jahren die OPG-Konzentrationen u.a. mit dem Geschlecht assoziiert sind [208, 209], können Untersuchungen in Kohorten mit unterschiedlicher Geschlechtsverteilung zu anderen Ergebnissen führen. Daher wurden in unserer Arbeit die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Serumkonzentrationen für das Geschlecht adjustiert. Auch nach erfolgter Adjustierung blieben die Unterschiede für die Serumkonzentrationen von sRANKL und OPG zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen erhalten (Tab. 15). Der diagnostische Wert, der durch eine ROC-Analyse ermittelten Diskriminierungswerte für sRANKL und OPG, zeigte jedoch nur eine niedrige Spezifität von ~ 50 % und damit eine LR^+ von 1,4 für sRANKL und 1,7 für OPG (Tab. 16). Daraus ergibt sich eine nur minimal erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer axSpA bei erhöhter Serumkonzentration von sRANKL bzw. OPG, was

prinzipiell nicht für die Eignung der Biomarker sRANKL und OPG als diagnostische Marker spricht.

Wie erwähnt, war ebenso der osteogene Wachstumsfaktor BMP-2 in Serumproben von axSpA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht (Tab. 15). Auch in einer Studie von Park et al. fanden sich erhöhte Konzentrationen bei Patienten mit AS für BMP-2 (und auch BMP-7) im Vergleich zu gesunden Kontrollen [210]. In dieser Studie waren die BMP-7 Serum-Konzentrationen bei AS-Patienten auch im Vergleich zu Patienten mit Rheumatoider Arthritis erhöht, während sich zwischen den beiden Patientengruppen die BMP-2 Konzentrationen nicht unterschieden [210]. BMP-2 Serumkonzentrationen über dem cut-off-Wert von 4000 ng/ml zeigten mit einer Sensitivität von 50 % und Spezifität von 94 % eine 8,3-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer axSpA an (Tab. 16). Damit ist der diagnostische Wert für BMP-2 (LR^+ 8,3) annähernd mit dem Wert des HLA-B27-Nachweis (LR^+ 9,0) vergleichbar.

Die Analyse der Entzündungs- und Translokationsmarker im Serum von axSpA-Patienten zeigte erhöhte Konzentrationen für LBP, nicht jedoch für sCD14. Erhöhte LBP-Serumkonzentrationen bei Patienten mit axSpA wurden bisher nur in einer früheren Studie beschrieben [211]. In unserer Studie erlauben LBP-Konzentrationen über 44,7 µg/ml eine sichere Diskriminierung zwischen axSpA-Patienten und gesunden Kontrollen mit einer Spezifität von 100 % und einer Sensitivität von 49 %. Erhöhte LBP-Konzentrationen zeigen eine 98-fach höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer axSpA an und stellen somit einen potenziell überzeugenden diagnostischen Biomarker dar (Tab. 16). Unter der Annahme normaler CRP-Werte bei den in dieser Arbeit untersuchten gesunden Kontrollen, kann für CRP-Werte > 6 mg/l eine LR^+ von 81 mit einer Spezifität von 100 % und einer Sensitivität von 40 % geschätzt werden. Im Vergleich zu CRP können also 10 % mehr Patienten anhand erhöhter LBP-Werte als axSpA-Patienten erkannt werden. LBP könnte demnach ein sensitiverer Marker als CRP für die Diagnosestellung der axSpA sein.

Die Quantifizierung der LPS-Konzentrationen wurden nur in einer kleinen Anzahl von Seren durchgeführt. Auffallend war, dass sich signifikant erhöhte LPS-Konzentrationen bei Patienten mit axSpA fanden (Abb. 14). Dies ist pathophysiologisch interessant und LPS

könnte als Translokationsmarker dienen. Der diagnostische Wert muss mit einer größeren Probenanzahl weiter untersucht werden.

Generell muss die diagnostische Wertigkeit der Parameter in klinisch relevanten Kontrollgruppen, d.h. Patienten mit Rückenschmerzen, weiter validiert werden. Diese Kontrollgruppen müssen dann auch Patienten mit degenerativen Wirbelsäulenerkrankungen beinhalten, die ebenfalls Veränderungen im Knorpel- und Knochenstoffwechsel aufweisen und die differenzialdiagnostisch von axSpA-Patienten abgegrenzt werden müssen. Somit ist es essenziell, vor allem die Validität der Knochen- und Knorpelparameter in einer solchen Patientengruppe zu untersuchen.

6.2 Korrelation der Serumkonzentrationen der Biomarker mit Krankheitsaktivität, Entzündung und strukturellen Schäden

Es erfolgte außerdem eine Untersuchung hinsichtlich der Assoziation der verschiedenen Serumprotein-Konzentrationen mit der Krankheitsaktivität, gemessen am BASDAI, mit systemischen Entzündungsparametern wie CRP und BSG und mit dem Vorhandensein von strukturellen Schäden, gemessen anhand des mSASSS oder dem Vorhandensein von Syndesmophyten zu Baseline.

Die univariate Analyse der Biomarker zeigte eine Assoziation der Serumkonzentrationen der Biomarker NTX-I, MMP-3, PINP, PIINP, OPG, LBP und VEGF mit dem Entzündungsparameter CRP, die auch in einem multivariaten Modell ihre Signifikanz behielten (Tab. 13+14).

Für keinen der analysierten Marker konnte ein Zusammenhang mit dem BASDAI festgestellt werden. Strukturelle Veränderungen an der Wirbelsäule, quantifiziert einerseits mittels mSASSS oder andererseits durch die Erfassung von Syndesmophyten zu Baseline, waren mit den Konzentrationen der Biomarker CTX-II, BMP-2, PINP, PIINP und LBP assoziiert. Im multivariaten Analysemodell waren nur die CTX-II- und BMP-2-Konzentrationen mit dem Vorhandensein von SD zu Baseline assoziiert.

Für einige Marker wurden ähnliche Zusammenhänge mit klinischen Parametern in anderen Patientenkohorten beobachtet. So konnten Maksymowych et al. ebenfalls einen Zusammenhang zwischen den MMP-3- und den CRP-Konzentrationen in Serumproben von

AS-Patienten zeigen [212]. Andere Forscher konnten jedoch keine Assoziation zwischen diesen beiden Parametern bei axSpA- und speziell bei AS-Patienten feststellen [213-215].

MMP-3 wird in den Gelenken von einer Vielzahl von Zellen, wie z.B. Makrophagen, Chondrozyten und Fibroblasten, unter dem Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokinen gebildet und wird daher als Marker für die Krankheitsaktivität bei Rheumatoider Arthritis diskutiert. So wurde z.B. ein Zusammenhang zwischen dem Grad der synovialen Entzündung im Kniegelenk und der MMP-3-Serumkonzentration bei Patienten mit peripherer SpA und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis beschrieben [84, 216]. Wie auch in unserer Analyse konnte in früheren Studien kein Zusammenhang zwischen den MMP-3-Serumkonzentrationen und dem BASDAI bei axSpA-Patienten und insbesondere bei AS-Patienten nachgewiesen werden [86, 212, 215]. Möglicherweise spielt MMP-3 als Marker für die Krankheitsaktivität eine größere Rolle bei der peripheren Form der SpA.

Die Wertigkeit von Knorpel- und Knochenumbau-Parametern als Indikatoren der Krankheitsaktivität oder struktureller Schäden wurde für verschiedene Gelenkerkrankungen untersucht. In einer Studie von Kim et al. wurden verschiedene Marker des Knorpelmetabolismus im Serum von AS-Patienten quantifiziert. Von allen Markern, die den Typ-2-Kollagenumbau reflektieren, korrelierte nur die Ratio der Auf- und Abbaumarker CPII/C2C (*C-propeptide of Type II collagen/ Collagen-2 ¾ long monoprotein*) mit den CRP Werten im Serum von AS-Patienten [197]. Der Nachweis von CPII ist mit dem in unserer Arbeit verwendeten PIINP vergleichbar, ebenso wie der Nachweis von C2C dem in unserer Arbeit verwendeten CTX-II entspricht. In unserer Studie korrelierte die Ratio zwischen PIINP und CTX-II gleichfalls mit den CRP-Werten, stärker war jedoch die Assoziation zwischen PIINP (Knorpelaufbaumarker) und CRP. Dies deutet auf einen erhöhten Knorpelumbau hin. Auch in histologischen Untersuchungen fand unsere Gruppe eine gesteigerte Typ-2-Kollagen-Expression bei AS-Patienten im hyalinen Knorpel von Facettengelenken, die sich im Ankylosierungsprozess befinden [unveröffentlichte Daten, Bleil et al.].

Andere Studien zeigten eine Korrelation zwischen dem Typ-1-Kollagen (Knochen-Abbaumarker) CTX-I und den CRP-Konzentrationen bei AS-Patienten [217]. Diese Assoziation ist mit dem von uns gefundenen Zusammenhang zwischen CRP und NTX-I vergleichbar, da CTX-I und NTX-I in äquimolaren Mengen beim Abbau des Typ-1-Kollagens entstehen. In

unserer Untersuchung war der Zusammenhang zwischen den PINP- (Knochenaufbaumarker) und den CRP-Konzentrationen stärker als zwischen NTX-I (Knochenabbauarker) und CRP. Für die Bewertung der Knochen-Neubildung bei SpA-Patienten wurden in der Vergangenheit andere Marker herangezogen, wie Osteokalzin oder die Knochen-spezifische Alkalische Phosphatase, die jedoch nicht mit dem CRP korrelierten [196, 214]. Während PINP im Bereich der Osteoporose-Forschung als Indikator der Knochen-Neubildung verwendet wird [218], gibt es kaum Daten über die Serumkonzentrationen von PINP bei SpA-Patienten. In einer frühen Studie von MacDonald et al. wurde das PINP-Äquivalent PICP (*C-terminal pro peptide of type-1 collagen*) in einer Kohorte von SpA-Patienten analysiert. In dieser Studie korrelierten die PICP-Serumkonzentrationen invers mit der BSG, nicht jedoch mit dem CRP-Wert [219]. In dieser Studie wurde ein anderes Verfahren (Radio-Immuno-Assay) für den Nachweis von PICP in einer kleinen Kohorte (n=27) verwendet, während in unserer Studie in 207 Serumproben mittels Enzym-Immuno-Assay die PINP-Konzentrationen quantifiziert wurden und der Nachweis des CRP mit der *high sensitive* Methode erfolgte. Die unterschiedlichen Testsysteme könnten einen Erklärungsansatz für die diskrepanten Ergebnisse darstellen.

Weiterhin fanden wir einen Zusammenhang zwischen den OPG- und CRP- Konzentrationen, jedoch nicht zwischen den OPG-Konzentrationen und dem BASDAI bei axSpA-Patienten (Tab. 13+14). Die Literaturdaten dazu sind sehr gegensätzlich. Im Kontrast zu unseren Resultaten konnten Taylan et al. für 55 AS-Patienten eine Korrelation der OPG-Konzentrationen mit dem BASDAI, aber keinen Zusammenhang zu den CRP-Konzentrationen aufzeigen [207]. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen beschrieben Chen et al. für 42 AS-Patienten eine Korrelation zwischen den OPG-Konzentrationen und dem CRP-Wert und fanden ebenfalls keine Assoziation mit dem BASDAI [202]. In unserer Analyse wurde ein Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen von OPG und dem Geschlecht sowie dem Raucherstatus der Patienten gezeigt (Tab. 13+14). Daher können die unterschiedlichen Ergebnisse der Untersuchungen in der Zusammensetzung der Studien-Population in Bezug auf das Alter, Geschlecht, Krankheitsaktivität und -stadium begründet sein.

Hinsichtlich der in unserer Analyse nachgewiesenen Korrelation der VEGF -Konzentrationen mit dem CRP-Wert (Tab. 13+14) fanden sich abweichende Ergebnisse in anderen Studien bei Patienten mit SpA [214, 220, 221]. Entgegen unseren Resultaten korrelierten bei Drouart et

al. die VEGF-Konzentrationen schwach mit dem BASDAI [221]. Dies könnte durch die Charakteristik der Patienten in dieser Kohorte verursacht sein, da 30 % der Patienten in dieser Studie, als Patienten mit Reaktiver Arthritis, Psoriasis-Arthritis und Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen klassifiziert wurden [221]. Ebenso könnte ein unterschiedlicher Raucherstatus der eingeschlossenen Patienten zu abweichenden Resultaten führen, da wir einen Zusammenhang zwischen den VEGF-Konzentrationen und dem Raucherstatus festgestellt haben, der auch in der Literatur mehrfach beschrieben wurde [222-224].

In der Literatur gibt es bisher keine Studien über die Assoziation von CRP und LBP bei Patienten mit axSpA. In unserer Analyse korrelierten die Serumkonzentrationen von LBP mit CRP bei axSpA-Patienten (Tab. 13 + 22). Eine Korrelation zwischen den beiden Akut-Phase-Proteinen LBP und CRP wurde bei Patienten mit Sepsis [225], Endokarditis [226], Morbus Crohn [227] und Arthritis [228] mehrfach beschrieben. Heumann et al. konnte bei Patienten mit Rheumatoider und Reaktiver Arthritis eine Korrelation zwischen den LBP- und CRP-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit aufzeigen [229].

Darüber hinaus korrelierte LBP in unserer Studie mit dem BMI, während für die CRP-Werte keine Korrelation zum BMI nachweisbar war (Tab. 13+14). Auch bei Patienten mit Insulinresistenz und Diabetes, bei denen eine milde chronische Entzündung eine wesentliche Rolle in der Pathogenese spielt, konnte ebenfalls eine Assoziation zwischen den LBP-Konzentrationen und dem BMI festgestellt werden [230, 231]. Ob LBP bei axSpA-Patienten ein Indikator bakterieller Translokation ist oder eher ein Marker systemischer Entzündung, bleibt vorerst unklar. Interessanterweise korrelierten in unserer Studie die LBP- (Tab. 13+14) ebenso wie die CRP-Konzentrationen (ohne Abb.) mit dem Vorhandensein einer röntgenologischen Sakroilitis. Dies unterstreicht den potenziellen Nutzen von LBP nicht nur für die Verwendung als Diagnosemarker für die axSpA, sondern auch für die Identifikation von AS-Patienten mit strukturellen Knochenveränderungen.

Unsere Analyse zeigte, dass CTX-II und BMP-2 Biomarker waren, deren Serumkonzentrationen eine Assoziation mit dem Vorhandensein struktureller Veränderungen an der Wirbelsäule zu Baseline aufwiesen (Tab. 14). Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate aus verschiedenen anderen Studien [196, 210, 232, 233]. Park et. al zeigte, dass die CTX-II-Serumkonzentration mit dem BASRI (*Bath Ankylosing Spondylitis*

Radiology Index) korrelierte und Vosse et. al konnte einen Zusammenhang zwischen dem mSASSS und den CTX-II Konzentrationen in Urinproben von AS-Patienten nachweisen [232]. Dies deutet darauf hin, dass die strukturellen Veränderungen in der Wirbelsäule mit dem Abbau von Knorpel assoziiert sind. Passend dazu fanden sich in histologischen Untersuchungen unserer Gruppe eine Abnahme der Knorpeldichte im Zuge des Gelenkumbaus bei AS-Patienten [234].

In unserer Arbeit konnte außerdem eine Assoziation zwischen dem osteogenen Wachstumsfaktor BMP-2 und dem Vorhandensein von SD zu Baseline sowie dem mSASSS zu Baseline bei Patienten mit axSpA gezeigt werden (Tab. 13). Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Studien überein [210, 233]. BMP's wurden ursprünglich als Faktoren identifiziert, die eine ektope Knochenbildung *in vivo* induzieren können. BMP-2 spielt eine Rolle bei der Chondrogenese und Osteogenese, sowohl in Vorläuferzellen (Prä-Osteoblasten und Mesenchymzellen) als auch in reifen Osteoblasten [235]. Die Assoziation der BMP-2-Serumkonzentrationen mit der Knochenneubildung weist auf eine mögliche Bedeutung von BMP-2 als Aktivator der Knochenneubildung bei AS-Patienten hin. Dies wird auch durch die fehlende Assoziation von BMP-2 (und CTX-II) mit systemischen Entzündungsparametern unterstützt.

6.3 Prognostische Bedeutung der analysierten Biomarker

Strukturelle Schäden, vor allem in Form der Syndesmophytenbildung, sind entscheidende prognosebestimmende Faktoren. Syndesmophyten (SD) schränken die Beweglichkeit der Wirbelsäule ein und führen zu erheblichen funktionellen Beeinträchtigungen im Alltag und Berufsleben [236-239]. Die Identifizierung von Patienten mit einem hohen Risiko für eine Progression struktureller Schäden an der Wirbelsäule ist daher essentiell um eine intensivisierte Risiko-adaptierte Therapie zu initiieren.

In früheren Studien ist das Vorhandensein von SD zu Baseline als wichtigster Prädiktor für die weitere Knochenneubildung an der Wirbelsäule identifiziert worden [20, 22, 240]. Neue Studien zeigen außerdem eine Assoziation der Knochenneubildung mit der Krankheitsaktivität (BASDAI) zu Baseline [241]. Als serologischer Parameter wurde eine erhöhte CRP-Konzentration (>6 mg/l) als prädiktiv für weitere SD-Progression beschrieben

[20]. Dabei war ein kontinuierlich erhöhter CRP-Wert über einen Zeitraum von 2 Jahren (*time-average CRP*) stärker mit der röntgenologischen Progression assoziiert als der CRP-Wert zu Baseline [20].

Strukturelle Veränderungen an der Wirbelsäule lassen sich röntgenologisch unterschiedlich definieren. Für diese Arbeit wurde die röntgenologische Progression innerhalb von 2 Jahren zum einen als mSASSS-Anstieg um 2 oder mehr Punkte und zum anderen als Neubildung von Syndesmophyten oder die Brückenbildung zwischen zwei Wirbeln durch das Zusammenwachsen von zwei einzelnen Syndesmophyten (Syndesmophyten-Progression) definiert. Während bei der Nutzung des mSASSS auch Prozesse des Knochenabbaus (z.B. Erosionen) in die Bewertung einfließen, wird mit der Erfassung der Syndesmophyten-Progression ausschließlich Knochenneubildung registriert. Für die Bewertung der Syndesmophyten-Progression wurden zu den lateralen Aufnahmen der Hals- und Lendenwirbelsäule, die auch für das mSASSS-Scoring verwendet werden, zusätzlich antero-posteriore Röntgenaufnahmen der Lendenwirbelsäule hinzugezogen, um auch laterale Syndesmophyten zu erfassen.

Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten mit axSpA ermittelten wir als unabhängige Prädiktoren für röntgenologische Progression, definiert als mSASSS Anstieg ≥ 2 Punkte, Rauchen (OR=2,5), das Vorhandensein einer röntgenologischen Sakroilitis beidseitig Grad II oder einseitig Grad III/IV (OR=3,3), die Behandlung der Patienten mit einem TNF-Inhibitor über 6 Monate (OR=5,7) und Syndesmophyten zu Baseline (OR =7,4). In Hinblick auf das Wachstum oder die Neubildung von SD innerhalb von 2 Jahren waren das Vorhandensein von Syndesmophyten (OR=16,6) und das Vorhandensein einer röntgenologischen Sakroilitis (OR=6,0) zu Baseline prädiktiv (Tab. 18).

In unserer Analyse waren Baseline CRP-Werte > 6 mg/l nicht für die Vorhersage einer röntgenologischen Progression geeignet. Sowohl für den mSASSS-Anstieg als auch für die SD-Progression bestand für Patienten mit erhöhten CRP-Konzentrationen nur ein ~ 2 -fach erhöhtes Risiko, dem jedoch die statistische Signifikanz fehlte (mSASSS [OR 2,2; $p=0,057$]; SD-Progression [OR 2,4; $p=0,053$]). Ebenfalls ungeeignet für die Vorhersage der röntgenologischen Progression war der BASDAI zu Baseline (mSASSS [OR 0,7; $p=0,350$]; SD-Progression [OR 1,2; $p=0,627$]; Tab. 18). Auch in der OASIS Studie, die einen Zusammenhang

von röntgenologischer Progression mit der Krankheitsaktivität zeigte, konnte kein Baseline-Entzündungsparameter als unabhängiger Prädiktor für röntgenologische Progression identifiziert werden [240]. Wie schon erwähnt war der *time-averaged CRP*-Wert stärker mit röntgenologischer Progression assoziiert als der Einzelwert zu Baseline [20]. In der OASIS-Kohorte war der ASDAS-CRP, eine Kombination aus Beschwerdestärke (Patienten-Angabe) und CRP, besser prädiktiv als der BASDAI oder der CRP-Wert. Es wird dennoch angenommen, dass eine kausale Beziehung zwischen Entzündung und Knochenneubildung besteht. Es wird allerdings vermutet, dass die initiale Entzündung Veränderungen am Gelenkknochen induziert, deren Umbau aber von Entzündungsmediatoren unabhängig verläuft.

Ein Hinweis auf die Entkopplung von Entzündung und röntgenologischer Progression leitet sich aus den Resultaten der anti-TNF- α -Therapie ab. Obwohl die Entzündungsaktivität bei AS-Patienten anhand serologischer Parameter (CRP oder IL-6), der Reduktion des BASDAI oder bildgebender Verfahren (MRT) nachweislich durch TNF- α -Blockade vermindert war, konnte die röntgenologische Progression zumindest bei einer Therapiedauer von 2 Jahren nicht gestoppt werden [186-188, 242]. Pedersen et al. gehen noch einen Schritt weiter und postulieren, dass die Beendigung der Entzündung eine Voraussetzung für die röntgenologische Progression sei [195].

Unabhängig von der beschriebenen Assoziation der CRP-Konzentration mit röntgenologischer Progression, zeigte Calprotectin [243] als weiterer Entzündungsassoziierter Biomarker einen Zusammenhang zur röntgenologischen Progression bei axSpA. Daneben wurde auch die Visfatin-Serumkonzentrationen [244] als prognostischer Marker für röntgenologische Progression identifiziert, ebenso wie Sklerostin [245] und Dickkopf-1 [246] als Marker des Knochen- und Knorpelmetabolismus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere serologische Biomarker identifiziert, die zur Vorhersage von röntgenologischer Progression bei Patienten mit axSpA in den folgenden 2 Jahren geeignet zu sein scheinen. So fanden sich erhöhte BMP-2-, PINP- und VEGF-Serumkonzentrationen in Patienten mit nachfolgender röntgenologischer Progression entweder definiert als mSASSS-Anstieg oder als SD-Progression (Tab. 17). Die PINP- und VEGF-Serumkonzentrationen waren mit dem Entzündungsparameter CRP assoziiert, während BMP-2 unabhängig von CRP und BSG war.

Für den osteogenen Wachstumsfaktor BMP-2 waren Serum-Konzentrationen > 4000 ng/ml prädiktiv für SD-Progression mit einer OR von 22,8. Dieser prädiktive Wert hatte mit 96 % die höchste Sensitivität. Für die Vorhersage eines mSASSS-Anstiegs um mindestens 2 Punkte wurden Werte > 7800 ng/ml ermittelt, die eine OR von 5,6 zeigten und mit 91 % die höchste Spezifität aufwiesen (Tab. 19).

Der Synthesemarker für Typ-I-Kollagen PINP dient als Marker für die Knochenneubildung. In unserer Studie konnten wir für axSpA-Patienten ein erhöhtes Risiko (OR=4,4) für SD-Progression bei Vorliegen von Serumkonzentrationen > 28 ng/ml zeigen. Für die mSASSS-Progression konnten wir für Konzentrationen > 24 ng/ml ein erhöhtes Risiko (OR=4,0) nachweisen (Tab. 19).

VEGF ist ein Überlebensfaktor für Endothelzellen und wird für das Zusammenspiel von Angiogenese und Osteogenese benötigt [70]. Wir konnten zeigen, dass VEGF-Serumkonzentrationen über 600 pg/ml prädiktiv für röntgenologische Progression waren, definiert als mSASSS-Anstieg > 2 Punkte (OR=3,1) und Serumkonzentrationen > 700 pg/ml für die Neubildung oder das Wachstum von SD (OR=3,8) bei Patienten mit axSpA im Zeitraum von 2 Jahren (Tab. 19) [247].

Die Assoziation aller genannten Biomarker blieb auch nach der Adjustierung für Co-Faktoren wie SD zu Baseline, Sakroilitis, Raucherstatus und die Behandlung mit einem TNF- α -Blocker erhalten. Im Gegensatz dazu ging die Assoziation von CRP mit dem mSASSS oder der SD-Progression nach Adjustierung in unserer Patienten-Kohorte verloren. Der Fakt, dass die Serumkonzentrationen von BMP-2, PINP und auch VEGF in der einmaligen Bestimmung zu Baseline eine signifikante Assoziation aufwiesen, deutet möglicherweise auf eine bessere Nutzbarkeit der neu identifizierten Biomarker als des CRP-Wertes für die Vorhersage struktureller Veränderungen in der Wirbelsäule bei axSpA-Patienten hin. Dafür muss die Wertigkeit der identifizierten Biomarker in unabhängigen Kohorten bestätigt werden.

Wir untersuchten auch die Kapazität der identifizierten Biomarker für die Vorhersage des Fortschreitens struktureller Schäden innerhalb der Patientengruppe, die aufgrund des Vorhandenseins von Syndesmophyten zu Baseline (Zeitpunkt des Studieneintritts) schon als Risikogruppe für röntgenologische Progression identifiziert werden konnte. Innerhalb dieser Patientengruppe hatte VEGF den höchsten prädiktiven Wert. Bei Patienten, die schon zu

Baseline SD und erhöhte VEGF-Konzentrationen aufwiesen, erhöhte sich das Risiko für röntgenologische Progression auf das ~ 14-fache für SD Progression und auf das 76-fache für die mSASSS-Progression innerhalb von 2 Jahren (Tab. 20A+B) [247]. Damit war VEGF dem CRP wiederum überlegen, da CRP-Konzentrationen > 6 mg/l mit einer OR von 1,1 mit SD-Progression und mit einer OR von 2,6 mit mSASSS-Progression bei Risikopatienten assoziiert war.

BMP-2 Serumkonzentrationen zeigten eine Assoziation mit der mSASSS Progression (OR=6,8) nicht jedoch mit der SD-Progression bei Risiko-Patienten mit SD zu Baseline. Nur erhöhte PINP-Konzentrationen zeigten eine Assoziation mit der mSASSS-Progression (OR=5,9) und der SD-Progression (OR=6,1) bei Risiko-Patienten (Tab. 20). Dies steht im Einklang mit aktuellen Daten; Arends et al. zeigte für AS-Patienten mit vollständiger Brückenbildung zwischen 2 Wirbelkörpern signifikant erhöhte PINP-Konzentrationen im Vergleich zu AS-Patienten mit einzelnen SD und ohne SD mit einer OR von 1,6 [217].

Neben VEGF fand sich auch eine Assoziation zwischen erhöhten Visfatin-Serumkonzentrationen und röntgenologischer Progression bei Patienten mit SD zu Baseline [244]. Somit scheinen VEGF und Visfatin neue Biomarker zu sein, die als Prädiktoren von röntgenologischer Progression bei AS-Patienten mit bekanntem Vorhandensein von SD geeignet sind. Ihre Validität diesbezüglich sollte in weiteren Studien und unabhängigen Patientenkohorten weiter untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit für die Anwendung von Biomarkern zur Vorhersage struktureller Schäden stellen Patienten in frühen Krankheitsstadien und Patienten, die mit einer TNF-Blocker-Therapie behandelt werden, dar. In der erstgenannten Gruppe ist eine Identifizierung von Patienten mit progredientem Verlauf und der Entwicklung struktureller Schäden von Interesse, um schon frühzeitig eine risikoadaptierte Therapie zu beginnen. Dafür könnten die hier identifizierten Biomarker – sowohl die Entzündungs-assoziierten VEGF und PINP als auch das CRP- unabhängige BMP-2, von Bedeutung sein.

Bei Patienten unter TNF-Blocker-Therapie kommt es häufig zu einer Normalisierung der Entzündungswerte, einschließlich des CRP; d.h. Entzündungs-assoziierte Biomarker werden eine begrenzte Bedeutung für die Vorhersage der Röntgen-Progression in dieser

Patientengruppe haben. So findet sich beispielsweise eine Reduktion der VEGF-Konzentration während einer anti-TNF- α -Behandlung über 4 Jahre [214, 220, 248].

Für die Identifikation von Patienten mit anhaltender röntgenologischer Progression unter dieser Therapie sind geeignete entzündungsunabhängige Biomarker nötig. Ein Ziel für die Zukunft ist, durch eine geeignete Kombinationstherapie mit Medikamenten, die spezifisch den Knochenaufbau hemmen, auch in diesen Patienten strukturelle Schäden zu verhindern.

Weitere Biomarker, die in unserer Untersuchung jeweils nur eine Assoziation mit der mSASSS-Progression oder der SD-Progression zeigten, waren NTX-I, MMP-3 und LBP.

So hatten erhöhte NTX-I-Serumkonzentrationen eine hohe Assoziation mit der mSASSS-Progression (OR=3,9), während NTX-I für die Progression von SD nicht prädiktiv war (Tab. 19). NTX-I entsteht beim Abbau des Typ-I-Kollagens und dient als Marker des Knochenabbaus. Ein Zusammenhang zwischen dem Kollagenabbaumarker CTX-I, dem Äquivalent zu NTX-I und röntgenologischer Progression innerhalb von 2 Jahren wurde bereits in früheren Studien beschrieben [196, 232].

Erhöhte MMP-3 Serumkonzentrationen (>35 ng/ml) waren für die Vorhersage von SD-Progression (OR=3,3), nicht jedoch für die Vorhersage von mSASSS-Progression prädiktiv (Tab. 19). MMP-3 ist am Abbau verschiedener Kollagene und an der Aktivierung von Proteasen beteiligt. In der RA wird MMP-3 als Marker der Krankheitsaktivität diskutiert [216, 249]. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigten Maksymowych et al., dass MMP-3-Werte > 68 ng/ml (Sensitivität 75 %, Spezifität 64 %) prädiktiv für einen mSASSS Anstieg um 3 Einheiten über 2 Jahre bei AS-Patienten waren [212]. Der 2-fach höhere prädiktive Wert in dieser Studie kann durch die unterschiedliche Definition der röntgenologischen Progression (d.h. den längeren Beobachtungszeitraum für die Bestimmung der röntgenologischen Progression) und die Zusammensetzung der analysierten Patientenkohorten erklärt werden.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fand sich in neueren Studien ebenfalls keine Assoziation zwischen den MMP-3-Konzentrationen und dem Vorhandensein von SD zu Baseline [215]. Pedersen et al. konnte nur bei Patienten mit peripherer Arthritis erhöhte MMP-3-Konzentrationen feststellen [199]. Dies weist auf eine größere Rolle von MMP-3 bei der peripheren Form der SpA hin.

In unserer Studie konnte nur bei 28 Patienten (13,5%) eine periphere Arthritis nachgewiesen werden, so dass eine Aussage zum Zusammenhang dieses Parameters mit den MMP-3-Konzentrationen nicht möglich war.

Erhöhte LBP-Konzentrationen waren mit einer mSASSS-Progression assoziiert (OR=4,7), nicht jedoch mit der SD-Progression. Nach der Adjustierung für die ermittelten Co-Faktoren verlor der prädiktive Wert jedoch seine Signifikanz (Tab. 19).

Die Assoziation der letztgenannten Biomarker mit nur einem Progressions-Parameter (mSASSS- oder SD-Progression) kann durch Unterschiede in der Erfassung röntgenologischer Progression liegen. Während der mSASSS sowohl destruktive Veränderungen erfasst, bezieht sich die SD-Progression lediglich auf die Neuentwicklung bzw. das Wachstum von vorhandenen Syndesmophyten. Andererseits könnte diese Diskrepanz auch auf eine geringere Assoziation mit den Progressions-Parametern und damit auf eine geringere Bedeutung dieser Marker für die Prädiktion struktureller Schäden bei axSpA hindeuten.

6.4 Indikatoren für bakterielle Translokation bei SpA-Patienten

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass es eine Verbindung zwischen der SpA und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gibt. Von den AS-Patienten entwickeln rund 10 % eine chronisch entzündliche Darmerkrankung und bei Patienten mit Morbus Crohn wird bei etwa 30 % der Patienten eine axiale oder periphere Arthritis beobachtet [250, 251]. Interessanterweise fanden sich bei mehr als 60 % der Patienten mit SpA ohne klinische Symptome einer Darmentzündung mikroskopische Entzündungszeichen in Darmbiopsien [39-43]. Es wird daher angenommen, dass mukosale Antigene einen Trigger der Gelenkentzündung bei der SpA darstellen könnten [39]. Der Übertritt mikrobieller Antigene durch das Darmepithel wird als Translokation bezeichnet und kann durch die Messung bakterieller Bestandteile, wie z.B. LPS, im Serum nachgewiesen werden. Daneben gilt auch der Nachweis erhöhter Konzentrationen von sCD14, LBP oder Antikörpern gegen bakterielle Strukturen im Serum als indirekter Hinweis auf eine Translokation [252, 253].

In der vorliegenden Arbeit wurde LPS in einem kleinen SpA-Patientenkollektiv im Serum bestimmt. In diesen Patienten haben wir zusätzlich die Konzentration des LPS bindenden

Proteins – LBP und des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 im Serum quantifiziert. Die Ergebnisse wurden mit gesunden Kontrollen verglichen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe fanden wir erhöhte Konzentrationen von LPS, LBP und IL-6 im Serum von axSpA-Patienten (Abb 14). Insbesondere der Nachweis von LPS deutet darauf hin, dass die intestinale Barrierefunktion in axSpA-Patienten beeinträchtigt sein könnte. Bei Sepsis-Patienten wurde gezeigt, dass der Anstieg der LBP Konzentrationen mit dem Vorhandensein von LPS enthaltenden Mikroorganismen (gram-negativen Bakterien) assoziiert war. Bei HIV-Infektionen korrelierte der Grad der mikrobiellen Translokation, definiert als Anstieg der LPS-Konzentrationen, mit dem Anstieg der LBP-Konzentrationen [97, 254, 255]. Darüber hinaus wurden auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) erhöhte LPS und LBP Konzentrationen beschrieben, die mit der Krankheitsaktivität korrelierten und sich nach einer Behandlung normalisierten [227, 256].

IL-6 wurde gleichfalls bei Patienten mit CED in hohen Konzentrationen in Serum- und Gewebeproben gefunden und korrelierte mit der Krankheitsaktivität [257-259]. Ebenso konnte bei Patienten mit axSpA erhöhte IL-6-Konzentrationen sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen und eine Korrelation zu den CRP-Konzentrationen gezeigt werden [260].

Mittels Korrelationsanalysen konnten wir einen Zusammenhang sowohl zwischen den CRP- und den IL-6-Serumkonzentrationen ($r=0,498$; $p=0,004$) als auch zwischen den LBP- und den IL-6-Serumkonzentrationen ($r=0,606$; $p=0,0004$) bei axSpA Patienten aufzeigen (Tab. 22). Eine Korrelation zwischen den CRP- und den IL-6-Konzentrationen bei axSpA-Patienten wurde ebenfalls von Bal et al. beschrieben [261]. CRP und LBP gehören zu den Akut-Phase-Proteinen, die im Rahmen einer Entzündungsreaktion in der Leber verstärkt produziert werden. IL-6 ist ein Hauptaktivator der Akut-Phase-Protein-Synthese. Durch die stärkere Assoziation von IL-6 zu LBP als zu CRP, könnte LBP ein sensitiverer Marker für die Entzündungsaktivität bei Patienten darstellen.

Dagegen scheint der Zusammenhang zwischen IL-6 und dem BASDAI von der untersuchten Patientengruppe abhängig zu sein, da es hierzu für axSpA-Patienten gegensätzliche Resultate gibt [211, 220, 261]. In unserer Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen IL-6 und dem BASDAI gefunden werden. Auch zwischen den LPS- und LBP-Konzentrationen konnten wir keinen Zusammenhang nachweisen, was mit Ergebnissen von Studien an Sepsis-Patienten

übereinstimmt [262]. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass zum einen LPS nicht der einzige Liganden für LBP ist [263, 264] und zum anderen, dass es nach einer LPS Stimulation zu einer zeitlich verzögerten LBP-Synthese kommt [263, 265].

Bisher gibt es keine Berichte über die Veränderung der LPS- sowie LBP-Konzentrationen unter verschiedenen Therapieansätzen, wie NSAR- bzw. TNF- α -Blocker-Therapien in axSpA-Patienten. Besonders interessant wäre die Untersuchung, ob eine TNF- α -Blocker-Therapie, die potenziell zur mukosalen Rekonstitution führen kann, auch eine Veränderung der LPS-Konzentration bewirkt.

6.5 *In vivo* Prä-Aktivierung von Monozyten bei axSpA-Patienten

Monozyten sind empfindliche Sensoren für bakterielle Antigene und Zytokine. So führt der Kontakt mit bakteriellen Antigenen oder auch die Exposition mit proinflammatorischen Zytokinen zu einer Aktivierung der Monozyten und zur Produktion von pro- und zeitverzögert von anti-inflammatorischen Zytokinen. Daten aus dem HLA-B27-transgenen Rattenmodell weisen eine Aktivierung von Antigen präsentierenden Zellen in diesem SpA-Modell nach [266, 267], was suggeriert, dass die Zellen der angeborenen Immunität eine wichtige Rolle in der SpA spielen.

In dieser Arbeit wurde daher die Funktion der Monozyten von axSpA-Patienten und gesunden Kontrollen anhand der Zytokinproduktion als Antwort auf die Stimulation von Vollblut mit verschiedenen TLR-/NOD-Liganden und der Phagozytoseaktivität untersucht.

Die im Vergleich zu Gesunden erhöhte Frequenz von Monozyten, die *in vitro* spontan IL-1 β und IL-1ra produzieren (Abb 16A), weist auf eine *in vivo* Prä-Aktivierung der Monozyten bei axSpA-Patienten hin. Darüber hinaus war die FSL- sowie MDP-induzierte Immunantwort insbesondere für IL-1 β erhöht (Abb 16C+E). Normalerweise induziert eine Stimulation mit dem NOD-2-Liganden MDP im Vollblut keine oder nur eine minimale Synthese von Zytokinen [268]. MDP übt jedoch einen synergistischen Effekt auf eine Stimulation mit dem TLR-4-Liganden LPS aus, was eine erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zur Folge hat [269, 270]. Da die Stimulation der Monozyten im Vollblut stattfand, könnte die MDP-induzierte Zytokinproduktion durch im Serum enthaltenes LPS potentiert worden sein. Andererseits könnte die Erhöhung auch Folge der Prä-Aktivierung sein.

Im Kontrast zeigten axSpA-Patienten eine eingeschränkte Reaktivität der Monozyten nach Stimulation mit LPS; insbesondere eine Reduktion der IL-6-Produktion und eine verminderte IL-10-Synthese (Abb. 16D + 17). Eine verminderte Reaktivität gegenüber LPS könnte auf eine Toleranzinduktion in den Monozyten hinweisen. Durch die Präsenz niedriger LPS-Konzentrationen können Monozyten *in vivo* desensibilisiert und gegenüber einer zweiten LPS-Exposition (*in vitro*) hyporesponsiv werden, d.h. eine reduzierte Kapazität zur Zytokinsynthese zeigen [271-273]. Allerdings zeigte sich eine wesentlich dramatischere Einschränkung der IL-10-Produktion, während die TNF- α -Produktion nur geringfügig reduziert war. In Sepsis-Patienten fand sich erst im Zustand der verminderten TNF- α -Synthese eine verringerte IL-10 Produktion, nicht jedoch bei Patienten mit erhaltener TNF- α -Produktion [272]. Insofern ist es nicht eindeutig, ob sich die verminderte Reaktivität auf LPS tatsächlich einem Zustand der Endotoxintoleranz zuordnen lässt oder ob es sich um einen Zustand der beginnenden funktionellen Erschöpfung der Monozyten handelt.

Wir untersuchten außerdem, ob die unterschiedliche Reaktivität der Monozyten auf Veränderungen der TLR-Expression zurückzuführen war. Für die Expression der Oberflächenmoleküle TLR-1, -2 und -4 auf CD14⁺ Monozyten konnten keine Unterschiede zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 19A). Die verminderte LPS-induzierte Zytokinproduktion bei axSpA-Patienten kann also nicht auf eine reduzierte TLR-4-Expression zurückgeführt werden. In einer früheren Arbeit von Yang et. al wurde eine erhöhte Expression von TLR-4 auf Monozyten bei AS-Patienten beobachtet. Dieser gegensätzliche Befund könnte sich dadurch erklären, dass Yang et al. die Identifikation der Monozyten auf die Charakteristik im FSC/SSC beschränkten und zudem HLA-B27⁺ AS-Patienten auswählte, die alle deutlich erhöhte CRP-Werte aufwiesen [274].

Besonders interessant waren die Assoziationen der spontanen, aber auch der MDP- und LPS-induzierten Zytokinproduktion mit dem BASDAI bei Patienten mit Standard-Therapie, während es keine Assoziation zum CRP gab (Tab. 22). Der Aktivierungsstatus der Monozyten scheint somit eine Entzündung sensibler anzuzeigen als der CRP-Wert. Möglicherweise ist auch ein stärkerer Stimulus für die Induktion des CRP in der Leber notwendig, als für die Aktivierung der Monozyten in der Peripherie.

Als weiteren Funktionsparameter der Monozyten untersuchten wir die Phagozytosekapazität. Zwischen axSpA-Patienten und Kontrollen konnten keine

Unterschiede in der Phagozytose von E.coli Partikeln gefunden werden (Abb. 21). Bei Patienten mit nrSpA, die sich also in einem frühen Stadium der SpA befanden, war die Phagozytose im Vergleich zu AS Patienten und zu Kontrollen vermindert. Dies muss in einer größeren Studie bestätigt werden.

In vitro-Studien zeigten, dass LPS-tolerante Monozyten eine normale Kapazität zur Phagozytose aufwiesen - d.h. eine normale Phagozytoseaktivität schließt eine Endotoxin-Toleranz der Monozyten nicht aus [275]. Die verminderte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Phagozytoseleistung könnte ein Anpassungsmechanismus sein, um die antimikrobielle Aktivität zu gewährleisten und gleichzeitig die schädliche Wirkung der pro-inflammatorischen Zytokine auf das umliegende Gewebe zu vermindern.

Bei axSpA-Patienten konnte tendenziell eine erhöhte Expression von HLA-DR beobachtet werden, was auf einen normalen bis moderat erhöhten Aktivierungsstatus und die Fähigkeit zur Antigenpräsentation der Monozyten hinweist (Abb. 19B). Zusätzlich wurde bei axSpA-Patienten eine verminderte Expression von CD16 auf Monozyten nachgewiesen, während die CD14 Expression im Vergleich zu Kontrollen unverändert war. Daher wurden die Monozyten-Subpopulationen basierend auf der Expression von CD14 und CD16 näher untersucht.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die klassischen $CD14^+CD16^-$ Monozyten bei Patienten mit axSpA im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht vorlagen, während bei den $CD16$ exprimierenden Monozyten nur die intermediären $CD14^{++}CD16^+$ Monozyten signifikant vermindert waren (Abb. 20). Erhöhte Frequenzen klassischer Monozyten bei AS-Patienten wurden auch in einer Studie von Surdacki et al. beschrieben [276]. Im Gegensatz dazu wurden bei Patienten mit RA und ebenfalls bei Patienten mit Morbus Crohn erhöhte Frequenzen an intermediären $CD14^{++}CD16^+$ Monozyten und bei Patienten mit Psoriasis-Arthritis erhöhte Frequenzen $CD16$ exprimierender Monozyten nachgewiesen [277, 278] [279]. Die nicht-klassischen $CD14^+CD16^+$ Monozyten werden als pro-inflammatorische Zellen beschrieben [173] und ein Anstieg dieser Zellen korrelierte bei RA-Patienten mit Entzündungsparametern und der Krankheitsaktivität [280, 281]. Daher könnte eine verminderte Expression von $CD16$ bei axSpA Patienten den chronischen Status der Entzündung bei den Patienten widerspiegeln. Ebenso könnte ein Ungleichgewicht der

Monozyten Subpopulationen einerseits auf eine erhöhte Rekrutierung von klassischen Monozyten aus dem Knochenmark oder andererseits auf eine vermehrte Migration nicht-klassischer Monozyten in entzündliche Gewebe hinweisen.

Die erhöhte Frequenz klassischer Monozyten steht im Einklang mit den signifikant erhöhten IL-6-Serumkonzentrationen bei Patienten mit axSpA (Abb. 14), da diese Subpopulation als Hauptproduzent von IL-6 beschrieben wurde [282, 283]. Im Gegensatz zu den pro-inflammatorisch wirksamen, nicht-klassischen $CD14^+CD16^+$ Monozyten, werden die intermediären $CD14^{++}CD16^+$ Monozyten als Hauptproduzenten von IL-10 nach Stimulation mit LPS beschrieben [174]. Dieser Aspekt könnte die in dieser Arbeit gezeigte, reduzierte IL-10-Antwort der peripheren Monozyten auf die Exposition mit LPS erklären, da diese Subpopulation bei axSpA-Patienten vermindert vorhanden war (Abb. 17).

Eine Analyse der Monozyten-Subpopulationen von Patienten mit Morbus Crohn vor und nach der Therapie mit dem anti-TNF- α -Inhibitor Infliximab zeigte einen weiteren Anstieg der $CD14^{++}CD16^+$ Monozyten [284]. Es wäre interessant, die Wirkung der TNF-Blockade auf die Zusammensetzung der Monozyten-Subpopulationen in einer größeren Kohorte von SpA-Patienten weiter zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Monozyten bei Patienten mit axSpA *in vivo* präaktiviert waren, mit einer erhöhten spontanen und durch MDP- und FSL induzierten Zytokinfreisetzung *in vitro* reagierten. Erhöhte LPS, IL-6 und LBP Konzentrationen im Serum der Patienten lassen auf eine Translokation, als möglichen Trigger dieser Präaktivierung schließen. Alternativ kann es sich aber auch um eine Zytokin-induzierte Präaktivierung handeln. Die reduzierte anti-inflammatorische IL-10-Antwort auf eine Stimulation mit LPS könnte auf die Verschiebung der Monozyten-Subpopulationen zu Gunsten der pro-inflammatorischen $CD14^+CD16^-$ Monozyten zurückzuführen sein.

Bei Patienten mit Standard-Therapie konnte ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität (BASDAI) und der spontanen, der LPS- und der MDP-induzierten Zytokinproduktion gezeigt werden, während kein Zytokin mit dem CRP-Wert assoziiert war. Zusätzlich konnte eine starke Assoziation zwischen den IL-6- und den LBP-Konzentrationen im Serum von Patienten mit axSpA nachgewiesen werden. LBP könnte daher einen sensitiveren Marker als CRP für die Entzündungsaktivität bei axSpA-Patienten darstellen.

7 Literaturverzeichnis

1. Rudwaleit M, Haibel H, Baraliakos X, Listing J, Marker-Hermann E, Zeidler H, Braun J, Sieper J. The early disease stage in axial spondylarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Arthritis and rheumatism* 2009;60(3):717-27.
2. Dougados M, Gueguen A, Nakache JP, Velicitat P, Zeidler H, Veys E, Calin A. Clinical relevance of C-reactive protein in axial involvement of ankylosing spondylitis. *The Journal of rheumatology* 1999;26(4):971-4.
3. Spoorenberg A, van der Heijde D, de Klerk E, Dougados M, de Vlam K, Mielants H, van der Tempel H, van der Linden S. Relative value of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis. *The Journal of rheumatology* 1999;26(4):980-4.
4. Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R, *et al.* The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Annals of the rheumatic diseases* 2009;68(6):777-83.
5. Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, *et al.* The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis and rheumatism* 1991;34(10):1218-27.
6. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, *et al.* Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* 2008;67(5):453-63.
7. Calin A. Early diagnosis of ankylosing spondylitis. *Lancet* 1977;2(8051):1293.
8. Calin A, Porta J, Fries JF, Schurman DJ. Clinical history as a screening test for ankylosing spondylitis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1977;237(24):2613-4.
9. Braun J, Bollow M, Remlinger G, Eggens U, Rudwaleit M, Distler A, Sieper J. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis and rheumatism* 1998;41(1):58-67.
10. Gofton JP, Robinson HS, Trueman GE. Ankylosing spondylitis in a Canadian Indian population. *Annals of the rheumatic diseases* 1966;25(6):525-7.
11. Khan MA. HLA-B27 and its subtypes in world populations. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7(4):263-9.
12. van der Linden SM, Valkenburg HA, de Jongh BM, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis and rheumatism* 1984;27(3):241-9.
13. Thomas GP, Brown MA. Genetics and genomics of ankylosing spondylitis. *Immunol Rev* 2010;233(1):162-80.
14. Bennett P, Wood, PH. Population studies of the rheumatic diseases.: Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1968.
15. Sieper J, Rudwaleit M, Baraliakos X, *et al.* The Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) handbook: a guide to assess spondyloarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2009;68 Suppl 2:ii1-44.
16. Hermann KG, Landewe RB, Braun J, van der Heijde DM. Magnetic resonance imaging of inflammatory lesions in the spine in ankylosing spondylitis clinical trials: is paramagnetic contrast medium necessary? *The Journal of rheumatology* 2005;32(10):2056-60.

17. Kellgren JH, Jeffrey MR, Ball J. The epidemiology of chronic rheumatism: Blackwell Scientific Publications, 1963.
18. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis and rheumatism* 1984;27(4):361-8.
19. Amor B, Dougados M, Mijiyawa M. [Criteria of the classification of spondylarthropathies]. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1990;57(2):85-9.
20. Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, Marker-Hermann E, Zeidler H, Braun J, Sieper J, Rudwaleit M. Baseline radiographic damage, elevated acute-phase reactant levels, and cigarette smoking status predict spinal radiographic progression in early axial spondylarthritis. *Arthritis and rheumatism* 2012;64(5):1388-98.
21. Poddubnyy D, Haibel H, Listing J, Marker-Hermann E, Zeidler H, Braun J, Sieper J, Rudwaleit M. Cigarette smoking has a dose-dependent impact on progression of structural damage in the spine in patients with axial spondyloarthritis: results from the GERman SPondyloarthritis Inception Cohort (GESPIC). *Annals of the rheumatic diseases* 2013;72(8):1430-2.
22. Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, Haibel H, Brandt J, Sieper J, Braun J. Progression of radiographic damage in patients with ankylosing spondylitis: defining the central role of syndesmophytes. *Annals of the rheumatic diseases* 2007;66(7):910-5.
23. Poddubnyy D, Rudwaleit M, Haibel H, Listing J, Marker-Hermann E, Zeidler H, Braun J, Sieper J. Rates and predictors of radiographic sacroiliitis progression over 2 years in patients with axial spondyloarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2011;70(8):1369-74.
24. Brown MA, Kennedy LG, Darke C, *et al.* The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism* 1998;41(3):460-5.
25. Reveille JD, Sims AM, Danoy P, *et al.* Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet*;42(2):123-7.
26. Cortes A, Hadler J, Pointon JP, *et al.* Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet*;45(7):730-8.
27. Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today* 1990;11(4):137-42.
28. Chan AT, Kollnberger SD, Wedderburn LR, Bowness P. Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondylarthritis. *Arthritis and rheumatism* 2005;52(11):3586-95.
29. Allen RL, O'Callaghan CA, McMichael AJ, Bowness P. Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol* 1999;162(9):5045-8.
30. Sitia R, Braakman I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 2003;426(6968):891-4.
31. Colbert RA, Tran TM, Layh-Schmitt G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Mol Immunol*;57(1):44-51.
32. Braun J, Tuszewski M, Ehlers S, Haberle J, Bollow M, Eggens U, Distler A, Sieper J. Nested polymerase chain reaction strategy simultaneously targeting DNA sequences of multiple bacterial species in inflammatory joint diseases. II. Examination of sacroiliac and knee joint biopsies of patients with spondyloarthropathies and other arthritides. *The Journal of rheumatology* 1997;24(6):1101-5.
33. Braun J, Bollow M, Neure L, *et al.* Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism* 1995;38(4):499-505.

34. Bollow M, Fischer T, Reissbauer H, Backhaus M, Sieper J, Hamm B, Braun J. Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis- cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. *Annals of the rheumatic diseases* 2000;59(2):135-40.
35. Gratacos J, Collado A, Filella X, *et al.* Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol* 1994;33(10):927-31.
36. Taurog JD, Maika SD, Satumtira N, *et al.* Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol Rev* 1999;169:209-23.
37. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, *et al.* Normal luminal bacteria, especially Bacteroides species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996;98(4):945-53.
38. Taurog JD, Hammer RE. Experimental spondyloarthropathy in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Rheumatol* 1996;15 Suppl 1:22-7.
39. Van Praet L, Van den Bosch FE, Jacques P, *et al.* Microscopic gut inflammation in axial spondyloarthritis: a multiparametric predictive model. *Annals of the rheumatic diseases* 2013;72(3):414-7.
40. Baeten D, De Keyser F, Mielants H, Veys EM. Immune linkages between inflammatory bowel disease and spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14(4):342-7.
41. Altomonte L, Zoli A, Veneziani A, *et al.* Clinically silent inflammatory gut lesions in undifferentiated spondyloarthropathies. *Clin Rheumatol* 1994;13(4):565-70.
42. Leirisalo-Repo M, Turunen U, Stenman S, Helenius P, Seppala K. High frequency of silent inflammatory bowel disease in spondylarthropathy. *Arthritis and rheumatism* 1994;37(1):23-31.
43. Simenon G, Van Gossum A, Adler M, Rickaert F, Appelboom T. Macroscopic and microscopic gut lesions in seronegative spondyloarthropathies. *The Journal of rheumatology* 1990;17(11):1491-4.
44. Mielants H, Veys EM, Cuvelier C, De Vos M. Course of gut inflammation in spondylarthropathies and therapeutic consequences. *Baillieres Clin Rheumatol* 1996;10(1):147-64.
45. Ergin A, Syrbe U, Scheer R, *et al.* Impaired peripheral Th1 CD4+ T cell response to Escherichia coli proteins in patients with Crohn's disease and ankylosing spondylitis. *J Clin Immunol*;31(6):998-1009.
46. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69(3):89-95.
47. Hulka BS, Wilcosky T. Biological markers in epidemiologic research. *Arch Environ Health* 1988;43(2):83-9.
48. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie: Georg Thieme Verlag, 2009.
49. Schünke M. Funktionelle Anatomie: Topografie und Funktion des Bewegungssystems: Georg Thieme Verlag, 2000.
50. Jörg Jerosch AB, Günter Uhr. Knochen curasan Taschenatlas spezial: Georg Thieme Verlag, 2002.
51. Appel H, Kuhne M, Spiekermann S, *et al.* Immunohistologic analysis of zygapophyseal joints in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism* 2006;54(9):2845-51.
52. Appel H, Loddenkemper C, Grozdanovic Z, *et al.* Correlation of histopathological findings and magnetic resonance imaging in the spine of patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 2006;8(5):R143.

53. Appel H, Kuhne M, Spiekermann S, Kohler D, Zacher J, Stein H, Sieper J, Loddenkemper C. Immunohistochemical analysis of hip arthritis in ankylosing spondylitis: evaluation of the bone-cartilage interface and subchondral bone marrow. *Arthritis and rheumatism* 2006;54(6):1805-13.
54. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 2010;11(4):219-27.
55. Baraliakos X, van der Heijde D, Braun J, Landewe RB. OMERACT magnetic resonance imaging initiative on structural and inflammatory lesions in ankylosing spondylitis--report of a special interest group at OMERACT 10 on sacroiliac joint and spine lesions. *The Journal of rheumatology* 2011;38(9):2051-4.
56. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med (Berl)* 2005;83(3):170-9.
57. Maksymowych WP, Chiowchanwisawakit P, Clare T, Pedersen SJ, Ostergaard M, Lambert RG. Inflammatory lesions of the spine on magnetic resonance imaging predict the development of new syndesmophytes in ankylosing spondylitis: evidence of a relationship between inflammation and new bone formation. *Arthritis and rheumatism* 2009;60(1):93-102.
58. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 1994;15(4):439-61.
59. Golub EE, Harrison G, Taylor AG, Camper S, Shapiro IM. The role of alkaline phosphatase in cartilage mineralization. *Bone Miner* 1992;17(2):273-8.
60. Kamiya N. The role of BMPs in bone anabolism and their potential targets SOST and DKK1. *Curr Mol Pharmacol* 2012;5(2):153-63.
61. Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(3):169-78.
62. Francis-West PH, Parish J, Lee K, Archer CW. BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development. *Cell Tissue Res* 1999;296(1):111-9.
63. Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, Chin GS, Steinbrech DS, Brent B, Gittes GK, Longaker MT. Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg* 2000;105(3):980-90.
64. Edwards CJ, Francis-West PH. Bone morphogenetic proteins in the development and healing of synovial joints. *Semin Arthritis Rheum* 2001;31(1):33-42.
65. Chubinskaya S, Kuettner KE. Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(9):1323-40.
66. Pecina M, Giltaij LR, Vukicevic S. Orthopaedic applications of osteogenic protein-1 (BMP-7). *Int Orthop* 2001;25(4):203-8.
67. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000;142(1):9-21.
68. Maiti SK, Singh GR. Bone morphogenetic proteins--novel regulators of bone formation. *Indian J Exp Biol* 1998;36(3):237-44.
69. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-76.
70. Clarkin CE, Gerstenfeld LC. VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication? *Cell Biochem Funct* 2013;31(1):1-11.
71. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999;5(6):623-8.

72. Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone* 2003;33(6):889-98.
73. Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CP. Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J Cell Physiol* 2008;214(2):537-44.
74. Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, Rodan SB. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest* 1994;93(6):2490-6.
75. Yoo SA, Bae DG, Ryoo JW, Kim HR, Park GS, Cho CS, Chae CB, Kim WU. Arginine-rich anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) hexapeptide inhibits collagen-induced arthritis and VEGF-stimulated productions of TNF-alpha and IL-6 by human monocytes. *J Immunol* 2005;174(9):5846-55.
76. Jansky L, Reymanova P, Kopecky J. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2003;52(6):593-8.
77. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell Tissue Res*;339(1):247-57.
78. Miyahara M, Njieha FK, Prockop DJ. Formation of collagen fibrils in vitro by cleavage of procollagen with procollagen proteinases. *J Biol Chem* 1982;257(14):8442-8.
79. Jansky L, Reymanova P, Kopecky J. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2003;52(5):593-8.
80. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4(8):617-29.
81. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 1992;267(6):3581-4.
82. Murphy G, Knauper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:S39-49.
83. Loffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 2011;38(1):191-208.
84. Vandooren B, Kruithof E, Yu DT, *et al.* Involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in peripheral synovitis and down-regulation by tumor necrosis factor alpha blockade in spondylarthropathy. *Arthritis and rheumatism* 2004;50(9):2942-53.
85. Chen CH, Lin KC, Yu DT, *et al.* Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ankylosing spondylitis: MMP-3 is a reproducibly sensitive and specific biomarker of disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45(4):414-20.
86. Yang C, Gu J, Rihl M, *et al.* Serum levels of matrix metalloproteinase 3 and macrophage colony-stimulating factor 1 correlate with disease activity in ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism* 2004;51(5):691-9.
87. Mamehara A, Sugimoto T, Sugiyama D, Morinobu S, Tsuji G, Kawano S, Morinobu A, Kumagai S. Serum matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Kobe J Med Sci* 2010;56(3):E98-107.
88. Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Archives of microbiology* 1995;164(6):383-9.
89. O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunological reviews* 2008;226:10-8.

90. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002;169(1):10-4.
91. McCormack WJ, Parker AE, O'Neill LA. Toll-like receptors and NOD-like receptors in rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* 2009;11(5):243.
92. Mathews RJ, Sprakes MB, McDermott MF. NOD-like receptors and inflammation. *Arthritis research & therapy* 2008;10(6):228.
93. Girardin SE, Travassos LH, Herve M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, Sansonetti PJ, Mengin-Lecreulx D. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(43):41702-8.
94. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990;249(4975):1429-31.
95. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, *et al.* Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *The Journal of experimental medicine* 1994;179(1):269-77.
96. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 2002;20:197-216.
97. Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *Journal of endotoxin research* 2005;11(4):225-9.
98. Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90(7):2744-8.
99. Wolk K, Witte E, Hoffmann U, *et al.* IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol* 2007;178(9):5973-81.
100. Wan Y, Freeswick PD, Khemlani LS, Kispert PH, Wang SC, Su GL, Billiar TR. Role of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. *Infection and immunity* 1995;63(7):2435-42.
101. Dentener MA, Vreugdenhil AC, Hoet PH, *et al.* Production of the acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by respiratory type II epithelial cells: implications for local defense to bacterial endotoxins. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000;23(2):146-53.
102. Liu S, Khemlani LS, Shapiro RA, *et al.* Expression of CD14 by hepatocytes: upregulation by cytokines during endotoxemia. *Infection and immunity* 1998;66(11):5089-98.
103. Wong GH, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 1989;58(5):923-31.
104. Pan Z, Zhou L, Hetherington CJ, Zhang DE. Hepatocytes contribute to soluble CD14 production, and CD14 expression is differentially regulated in hepatocytes and monocytes. *The Journal of biological chemistry* 2000;275(46):36430-5.
105. Gutschmann T, Muller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infection and immunity* 2001;69(11):6942-50.
106. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology* 2005;5(12):953-64.
107. Taylor PR, Gordon S. Monocyte heterogeneity and innate immunity. *Immunity* 2003;19(1):2-4.

108. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116(16):e74-80.
109. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, *et al.* Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87(18):7260-4.
110. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, Narni-Mancinelli E, Lauvau G. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunology and cell biology* 2008;86(5):398-408.
111. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews Immunology* 2011;11(11):762-74.
112. Holländer GA. *Immunologie*: Fischer Verlag, 2006.
113. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Critical reviews in immunology* 2011;31(5):379-446.
114. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, *et al.* Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1985;260(4):2345-54.
115. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology* 2008;214(2):149-60.
116. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annual review of cell biology* 1993;9:317-43.
117. Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(9):736-46.
118. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 2010;20(2):87-103.
119. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews Immunology* 2003;3(9):745-56.
120. Dinarello CA. The pathophysiology of the pro-inflammatory cytokines. *Biotherapy* 1990;2(3):189-91.
121. Feldmann M, Brennan FM, Elliott MJ, Williams RO, Maini RN. TNF alpha is an effective therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1995;766:272-8.
122. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 1999;169:175-94.
123. Brandt J, Sieper J, Braun J. Infliximab in the treatment of active and severe ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20(6 Suppl 28):S106-10.
124. Braun J, Landewe R, Hermann KG, Han J, Yan S, Williamson P, van der Heijde D. Major reduction in spinal inflammation in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled magnetic resonance imaging study. *Arthritis and rheumatism* 2006;54(5):1646-52.
125. Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, Brandt J, Sieper J, Braun J. Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 2 years of treatment with the tumour necrosis factor alpha antibody infliximab. *Annals of the rheumatic diseases* 2005;64(10):1462-6.
126. Braun J, Brandt J, Listing J, *et al.* Two year maintenance of efficacy and safety of infliximab in the treatment of ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases* 2005;64(2):229-34.

127. Sieper J, Rudwaleit M, Braun J. Adalimumab for the treatment of ankylosing spondylitis. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8(6):831-8.
128. Sieper J, van der Heijde D, Dougados M, Brown LS, Lavie F, Pangan AL. Early response to adalimumab predicts long-term remission through 5 years of treatment in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases* 2012;71(5):700-6.
129. Poddubnyy D, Rudwaleit M. Efficacy and safety of adalimumab treatment in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Expert Opin Drug Saf* 2011;10(4):655-73.
130. McLeod C, Bagust A, Boland A, *et al.* Adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of ankylosing spondylitis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2007;11(28):1-158, iii-iv.
131. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992;356(6372):768-74.
132. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991;77(8):1627-52.
133. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011;117(14):3720-32.
134. Colotta F, Saccani S, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Introna M, Mantovani A. Regulated expression and release of the IL-1 decoy receptor in human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 1996;156(7):2534-41.
135. Dinarello CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *The New England journal of medicine* 1984;311(22):1413-8.
136. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* 1992;6(8):2591-9.
137. Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA. Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest* 1986;77(2):645-8.
138. Fleischmann R. Anakinra in the treatment of rheumatic disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2006;2(3):331-40.
139. Cohen SB. The use of anakinra, an interleukin-1 receptor antagonist, in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30(2):365-80, vii.
140. Nuki G, Bresnihan B, Bear MB, McCabe D. Long-term safety and maintenance of clinical improvement following treatment with anakinra (recombinant human interleukin-1 receptor antagonist) in patients with rheumatoid arthritis: extension phase of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis and rheumatism* 2002;46(11):2838-46.
141. Haibel H, Rudwaleit M, Listing J, Sieper J. Open label trial of anakinra in active ankylosing spondylitis over 24 weeks. *Annals of the rheumatic diseases* 2005;64(2):296-8.
142. Bauer J, Ganter U, Geiger T, *et al.* Regulation of interleukin-6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Blood* 1988;72(4):1134-40.
143. de Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE. Interleukin-10. Current opinion in immunology 1992;4(3):314-20.
144. Amano Y, Lee SW, Allison AC. Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability. *Molecular pharmacology* 1993;43(2):176-82.

145. Chalaris A, Garbers C, Rabe B, Rose-John S, Scheller J. The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *European journal of cell biology* 2011;90(6-7):484-94.
146. Castell JV, Andus T, Kunz D, Heinrich PC. Interleukin-6. The major regulator of acute-phase protein synthesis in man and rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1989;557:87-99; discussion 100-1.
147. Kishimoto T, Hirano T. Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annual review of immunology* 1988;6:485-512.
148. Takatsuki F, Okano A, Suzuki C, *et al.* Human recombinant IL-6/B cell stimulatory factor 2 augments murine antigen-specific antibody responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 1988;141(9):3072-7.
149. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994;83(1):113-8.
150. Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, Woodworth T, Alten R. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* 2008;371(9617):987-97.
151. Cohen JD, Ferreira R, Jorgensen C. Ankylosing spondylitis refractory to tumor necrosis factor blockade responds to tocilizumab. *The Journal of rheumatology* 2011;38(7):1527.
152. Henes JC, Horger M, Guenaydin I, Kanz L, Koetter I. Mixed response to tocilizumab for ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases* 2010;69(12):2217-8.
153. Shima Y, Tomita T, Ishii T, Morishima A, Maeda Y, Ogata A, Kishimoto T, Tanaka T. Tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, ameliorated clinical symptoms and MRI findings of a patient with ankylosing spondylitis. *Mod Rheumatol* 2011;21(4):436-9.
154. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174(5):1209-20.
155. Chin J, Kostura MJ. Dissociation of IL-1 beta synthesis and secretion in human blood monocytes stimulated with bacterial cell wall products. *J Immunol* 1993;151(10):5574-85.
156. Ralph P, Nakoinz I, Sampson-Johannes A, Fong S, Lowe D, Min HY, Lin L. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1992;148(3):808-14.
157. Gruber MF, Williams CC, Gerrard TL. Macrophage-colony-stimulating factor expression by anti-CD45 stimulated human monocytes is transcriptionally up-regulated by IL-1 beta and inhibited by IL-4 and IL-10. *J Immunol* 1994;152(3):1354-61.
158. Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, Calzetti F, Bonora S. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med* 1994;179(5):1695-9.
159. Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A, James SL. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* 1992;148(11):3578-82.
160. Schandene L, Alonso-Vega C, Willems F, *et al.* B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol* 1994;152(9):4368-74.
161. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
162. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 1999;17:593-623.

163. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. *Advances in immunology* 2007;96:179-204.
164. Chung EY, Kim SJ, Ma XJ. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell research* 2006;16(2):154-61.
165. Ziegler-Heitbrock HW, Passlick B, Flieger D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma* 1988;7(6):521-7.
166. Almeida J, Bueno C, Alguero MC, *et al.* Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clin Immunol* 2001;100(3):325-38.
167. Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, Schraut W, Stelter F, Schutt C, Passlick B, Pforte A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 1993;23(9):2053-8.
168. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989;74(7):2527-34.
169. Dimitrov S, Shaikh F, Pruitt C, Green M, Wilson K, Beg N, Hong S. Differential TNF production by monocyte subsets under physical stress: blunted mobilization of proinflammatory monocytes in prehypertensive individuals. *Brain Behav Immun* 2013;27(1):101-8.
170. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 2002;168(7):3536-42.
171. Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun* 1998;66(6):2782-90.
172. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, *et al.* Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One* 2010;5(6):e11049.
173. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007;81(3):584-92.
174. Skrzeczynska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 2008;67(2):152-9.
175. Waldo SW, Li Y, Buono C, Zhao B, Billings EM, Chang J, Kruth HS. Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *The American journal of pathology* 2008;172(4):1112-26.
176. Davey FR, Cordell JL, Erber WN, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY. Monoclonal antibody (Y1/82A) with specificity towards peripheral blood monocytes and tissue macrophages. *J Clin Pathol* 1988;41(7):753-8.
177. Saito N, Pulford KA, Breton-Gorius J, Masse JM, Mason DY, Cramer EM. Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes. *The American journal of pathology* 1991;139(5):1053-9.
178. Ramprasad MP, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O, Steinberg D. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(25):14833-8.

179. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, Landis RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circulation research* 2004;94(1):119-26.
180. Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL, Somoza C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1993;366(6450):76-9.
181. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;3(5):541-7.
182. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual review of immunology* 1996;14:233-58.
183. Huerta-Sil G, Casasola-Vargas JC, Londono JD, *et al.* Low grade radiographic sacroiliitis as prognostic factor in patients with undifferentiated spondyloarthritis fulfilling diagnostic criteria for ankylosing spondylitis throughout follow up. *Annals of the rheumatic diseases* 2006;65(5):642-6.
184. Poddubnyy D, Rudwaleit M, Haibel H, Listing J, Marker-Hermann E, Zeidler H, Braun J, Sieper J. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Annals of the rheumatic diseases*;71(10):1616-22.
185. Wanders A, Heijde D, Landewe R, Behier JM, Calin A, Olivieri I, Zeidler H, Dougados M. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis and rheumatism* 2005;52(6):1756-65.
186. van der Heijde D, Landewe R, Baraliakos X, *et al.* Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism* 2008;58(10):3063-70.
187. van der Heijde D, Landewe R, Einstein S, *et al.* Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis and rheumatism* 2008;58(5):1324-31.
188. van der Heijde D, Salonen D, Weissman BN, *et al.* Assessment of radiographic progression in the spines of patients with ankylosing spondylitis treated with adalimumab for up to 2 years. *Arthritis Res Ther* 2009;11(4):R127.
189. Braun J, Baraliakos X, Hermann KG, *et al.* The effect of two golimumab doses on radiographic progression in ankylosing spondylitis: results through 4 years of the GO-RAISE trial. *Annals of the rheumatic diseases*;73(6):1107-13.
190. van der Heijde D, Landewe R, van der Linden S. How should treatment effect on spinal radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis be measured? *Arthritis and rheumatism* 2005;52(7):1979-85.
191. van Jaarsveld CH, ter Borg EJ, Jacobs JW, *et al.* The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17(6):689-97.
192. Rudwaleit M, van der Heijde D, Khan MA, Braun J, Sieper J. How to diagnose axial spondyloarthritis early. *Ann Rheum Dis* 2004;63(5):535-43.
193. Rudwaleit M, Khan MA, Sieper J. The challenge of diagnosis and classification in early ankylosing spondylitis: do we need new criteria? *Arthritis and rheumatism* 2005;52(4):1000-8.
194. Jacques P, Elewaut D. Spondyloarthritis: Gut inflammation in SpA: flagellin joins the dance? *Nat Rev Rheumatol*;10(1):5-6.

195. Pedersen SJ, Sorensen IJ, Lambert RG, *et al.* Radiographic progression is associated with resolution of systemic inflammation in patients with axial spondylarthritis treated with tumor necrosis factor alpha inhibitors: a study of radiographic progression, inflammation on magnetic resonance imaging, and circulating biomarkers of inflammation, angiogenesis, and cartilage and bone turnover. *Arthritis and rheumatism*;63(12):3789-800.
196. Park MC, Chung SJ, Park YB, Lee SK. Bone and cartilage turnover markers, bone mineral density, and radiographic damage in men with ankylosing spondylitis. *Yonsei Med J* 2008;49(2):288-94.
197. Kim TH, Stone M, Payne U, *et al.* Cartilage biomarkers in ankylosing spondylitis: relationship to clinical variables and treatment response. *Arthritis and rheumatism* 2005;52(3):885-91.
198. Maksymowych WP, Rahman P, Shojania K, Olszynski WP, Thomson GT, Ballal S, Wong RL, Inman RD. Beneficial effects of adalimumab on biomarkers reflecting structural damage in patients with ankylosing spondylitis. *The Journal of rheumatology* 2008;35(10):2030-7.
199. Pedersen SJ, Sorensen IJ, Garnero P, *et al.* ASDAS, BASDAI and different treatment responses and their relation to biomarkers of inflammation, cartilage and bone turnover in patients with axial spondyloarthritis treated with TNFalpha inhibitors. *Annals of the rheumatic diseases*;70(8):1375-81.
200. Garnero P, Conrozier T, Christgau S, Mathieu P, Delmas PD, Vignon E. Urinary type II collagen C-telopeptide levels are increased in patients with rapidly destructive hip osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2003;62(10):939-43.
201. Christensen AF, Lottenburger T, Lindegaard H, Christgau S, Horslev-Petersen K, Junker P. Differential association of the N-propeptide of collagen IIA (PIIANP) and collagen II C-telopeptide (CTX-II) with synovitis and erosions in early and longstanding rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27(2):307-14.
202. Chen CH, Chen HA, Liao HT, Liu CH, Tsai CY, Chou CT. Soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in ankylosing spondylitis: OPG is associated with poor physical mobility and reflects systemic inflammation. *Clin Rheumatol*;29(10):1155-61.
203. Grisar J, Bernecker PM, Aringer M, *et al.* Ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, and reactive arthritis show increased bone resorption, but differ with regard to bone formation. *The Journal of rheumatology* 2002;29(7):1430-6.
204. Kwon SR, Lim MJ, Suh CH, *et al.* Dickkopf-1 level is lower in patients with ankylosing spondylitis than in healthy people and is not influenced by anti-tumor necrosis factor therapy. *Rheumatol Int*;32(8):2523-7.
205. Kim HR, Lee SH, Kim HY. Elevated serum levels of soluble receptor activator of nuclear factors-kappaB ligand (sRANKL) and reduced bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis (AS). *Rheumatology (Oxford)* 2006;45(10):1197-200.
206. Franck H, Meurer T, Hofbauer LC. Evaluation of bone mineral density, hormones, biochemical markers of bone metabolism, and osteoprotegerin serum levels in patients with ankylosing spondylitis. *The Journal of rheumatology* 2004;31(11):2236-41.
207. Taylan A, Sari I, Akinci B, *et al.* Biomarkers and cytokines of bone turnover: extensive evaluation in a cohort of patients with ankylosing spondylitis. *BMC Musculoskelet Disord*;13:191.
208. Trofimov S, Pantsulaia I, Kobylansky E, Livshits G. Circulating levels of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand/osteoprotegerin/macrophage-colony stimulating factor in a presumably healthy human population. *Eur J Endocrinol* 2004;150(3):305-11.
209. Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ, 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Dunstan C, Riggs BL. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos Int* 2002;13(5):394-9.
210. Park MC, Park YB, Lee SK. Relationship of bone morphogenetic proteins to disease activity and radiographic damage in patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 2008;37(3):200-4.

-
211. Londono J, Romero-Sanchez MC, Torres VG, *et al.* The association between serum levels of potential biomarkers with the presence of factors related to the clinical activity and poor prognosis in spondyloarthritis. *Rev Bras Reumatol*;52(4):536-44.
212. Maksymowych WP, Landewe R, Conner-Spady B, *et al.* Serum matrix metalloproteinase 3 is an independent predictor of structural damage progression in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism* 2007;56(6):1846-53.
213. Woo JH, Lee HJ, Sung IH, Kim TH. Changes of clinical response and bone biochemical markers in patients with ankylosing spondylitis taking etanercept. *The Journal of rheumatology* 2007;34(8):1753-9.
214. Appel H, Janssen L, Listing J, Heydrich R, Rudwaleit M, Sieper J. Serum levels of biomarkers of bone and cartilage destruction and new bone formation in different cohorts of patients with axial spondyloarthritis with and without tumor necrosis factor-alpha blocker treatment. *Arthritis Res Ther* 2008;10(5):R125.
215. Almodovar R, Rios V, Ocana S, Gobbo M, Casas ML, Zarco-Montejo P, Juanola X. Association of biomarkers of inflammation, cartilage and bone turnover with gender, disease activity, radiological damage and sacroiliitis by magnetic resonance imaging in patients with early spondyloarthritis. *Clin Rheumatol*;33(2):237-41.
216. Galil SM, El-Shafey AM, Hagrass HA, Fawzy F, Sammak AE. Baseline serum level of matrix metalloproteinase-3 as a biomarker of progressive joint damage in rheumatoid arthritis patients. *Int J Rheum Dis*.
217. Arends S, Spoorenberg A, Efde M, *et al.* Higher bone turnover is related to spinal radiographic damage and low bone mineral density in ankylosing spondylitis patients with active disease: a cross-sectional analysis. *PLoS One*;9(6):e99685.
218. Arends S, Spoorenberg A, Bruyn GA, Houtman PM, Leijnsma MK, Kallenberg CG, Brouwer E, van der Veer E. The relation between bone mineral density, bone turnover markers, and vitamin D status in ankylosing spondylitis patients with active disease: a cross-sectional analysis. *Osteoporos Int*;22(5):1431-9.
219. MacDonald AG, Birkinshaw G, Durham B, Bucknall RC, Fraser WD. Biochemical markers of bone turnover in seronegative spondylarthropathy: relationship to disease activity. *Br J Rheumatol* 1997;36(1):50-3.
220. Visvanathan S, Wagner C, Marini JC, Baker D, Gathany T, Han J, van der Heijde D, Braun J. Inflammatory biomarkers, disease activity and spinal disease measures in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab. *Annals of the rheumatic diseases* 2008;67(4):511-7.
221. Drouart M, Saas P, Billot M, Cedoz JP, Tiberghien P, Wendling D, Toussirot E. High serum vascular endothelial growth factor correlates with disease activity of spondylarthropathies. *Clin Exp Immunol* 2003;132(1):158-62.
222. Raidl M, Sibbing B, Strauch J, *et al.* Impaired TNFalpha-induced VEGF expression in human airway smooth muscle cells from smokers with COPD: role of MAPkinases and histone acetylation--effect of dexamethasone. *Cell Biochem Biophys* 2007;49(2):98-110.
223. Rovina N, Papapetropoulos A, Kollintza A, Michailidou M, Simoes DC, Roussos C, Gratziau C. Vascular endothelial growth factor: an angiogenic factor reflecting airway inflammation in healthy smokers and in patients with bronchitis type of chronic obstructive pulmonary disease? *Respir Res* 2007;8:53.
224. Edirisinghe I, Yang SR, Yao H, *et al.* VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction. *FASEB J* 2008;22(7):2297-310.
225. Tschakowsky K, Hedwig-Geissing M, Schmidt J, Braun GG. Lipopolysaccharide-binding protein for monitoring of postoperative sepsis: complementary to C-reactive protein or redundant? *PLoS One*;6(8):e23615.

-
226. Vollmer T, Piper C, Kleesiek K, Dreier J. Lipopolysaccharide-binding protein: a new biomarker for infectious endocarditis? Clin Chem 2009;55(2):295-304.
227. Lakatos PL, Kiss LS, Palatka K, *et al.* Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis;17(3):767-77.
228. Heumann D, Bas S, Gallay P, Le Roy D, Barras C, Mensi N, Glauser MP, Vischer T. Lipopolysaccharide binding protein as a marker of inflammation in synovial fluid of patients with arthritis: correlation with interleukin 6 and C-reactive protein. J Rheumatol 1995;22(7):1224-9.
229. Heumann D, Gallay P, Le Roy D, Glauser MP. Contribution of lipopolysaccharide binding protein (LBP) in endotoxemic shock in mice. Prog Clin Biol Res 1995;392:465-71.
230. Rathmann W, Haastert B, Giani G, Koenig W, Imhof A, Herder C, Holle R, Mielck A. Is inflammation a causal chain between low socioeconomic status and type 2 diabetes? Results from the KORA Survey 2000. Eur J Epidemiol 2006;21(1):55-60.
231. Beijers HJ, Ferreira I, Spronk HM, Bravenboer B, Dekker JM, Nijpels G, ten Cate H, Stehouwer CD. Impaired glucose metabolism and type 2 diabetes are associated with hypercoagulability: potential role of central adiposity and low-grade inflammation--the Hoorn Study. Thromb Res;129(5):557-62.
232. Vosse D, Landewe R, Garnero P, van der Heijde D, van der Linden S, Geusens P. Association of markers of bone- and cartilage-degradation with radiological changes at baseline and after 2 years follow-up in patients with ankylosing spondylitis. Rheumatology (Oxford) 2008;47(8):1219-22.
233. Chen HA, Chen CH, Lin YJ, Chen PC, Chen WS, Lu CL, Chou CT. Association of bone morphogenetic proteins with spinal fusion in ankylosing spondylitis. The Journal of rheumatology;37(10):2126-32.
234. Bleil J, Maier R, Hempfing A, Schlichting U, Appel H, Sieper J, Syrbe U. Histomorphologic and histomorphometric characteristics of zygapophyseal joint remodeling in ankylosing spondylitis. Arthritis Rheumatol;66(7):1745-54.
235. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, *et al.* Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). J Bone Joint Surg Am 2003;85-A(8):1544-52.
236. Kobelt G, Andlin-Sobocki P, Brophy S, Jonsson L, Calin A, Braun J. The burden of ankylosing spondylitis and the cost-effectiveness of treatment with infliximab (Remicade). Rheumatology (Oxford) 2004;43(9):1158-66.
237. Wanders A, Landewe R, Dougados M, Mielants H, van der Linden S, van der Heijde D. Association between radiographic damage of the spine and spinal mobility for individual patients with ankylosing spondylitis: can assessment of spinal mobility be a proxy for radiographic evaluation? Annals of the rheumatic diseases 2005;64(7):988-94.
238. Machado P, Landewe R, Braun J, Hermann KG, Baker D, van der Heijde D. Both structural damage and inflammation of the spine contribute to impairment of spinal mobility in patients with ankylosing spondylitis. Annals of the rheumatic diseases;69(8):1465-70.
239. Landewe R, Dougados M, Mielants H, van der Tempel H, van der Heijde D. Physical function in ankylosing spondylitis is independently determined by both disease activity and radiographic damage of the spine. Annals of the rheumatic diseases 2009;68(6):863-7.
240. van Tubergen A, Ramiro S, van der Heijde D, Dougados M, Mielants H, Landewe R. Development of new syndesmophytes and bridges in ankylosing spondylitis and their predictors: a longitudinal study. Annals of the rheumatic diseases;71(4):518-23.
241. Ramiro S, van der Heijde D, van Tubergen A, Stolwijk C, Dougados M, van den Bosch F, Landewe R. Higher disease activity leads to more structural damage in the spine in ankylosing spondylitis: 12-year longitudinal data from the OASIS cohort. Annals of the rheumatic diseases;73(8):1455-61.

242. Baraliakos X, Listing J, Brandt J, Haibel H, Rudwaleit M, Sieper J, Braun J. Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 4 yrs of treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46(9):1450-3.
243. Turina MC, Sieper J, Yeremenko N, Conrad K, Haibel H, Rudwaleit M, Baeten D, Poddubnyy D. Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*;73(9):1746-8.
244. Syrbe U, Callhoff J, Conrad K, *et al.* Adipokine serum levels in patients with ankylosing spondylitis and their relation to clinical parameters and radiographic spinal progression. *Arthritis Rheumatol.*
245. Appel H, Ruiz-Heiland G, Listing J, *et al.* Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism* 2009;60(11):3257-62.
246. Heiland GR, Appel H, Poddubnyy D, *et al.* High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*;71(4):572-4.
247. Poddubnyy D, Conrad K, Haibel H, Syrbe U, Appel H, Braun J, Rudwaleit M, Sieper J. Elevated serum level of the vascular endothelial growth factor predicts radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2013.
248. Pedersen SJ, Hetland ML, Sorensen IJ, Ostergaard M, Nielsen HJ, Johansen JS. Circulating levels of interleukin-6, vascular endothelial growth factor, YKL-40, matrix metalloproteinase-3, and total aggrecan in spondyloarthritis patients during 3 years of treatment with TNFalpha inhibitors. *Clin Rheumatol*;29(11):1301-9.
249. Ally MM, Hodgkinson B, Meyer PW, Musenge E, Tikly M, Anderson R. Serum matrix metalloproteinase-3 in comparison with acute phase proteins as a marker of disease activity and radiographic damage in early rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*;2013:183653.
250. Mielants H, Veys EM, Cuvelier C, De Vos M, Goemaere S, De Clercq L, Schatteman L, Elewaut D. The evolution of spondyloarthropathies in relation to gut histology. II. Histological aspects. *The Journal of rheumatology* 1995;22(12):2273-8.
251. Orchard TR, Holt H, Bradbury L, Hammersma J, McNally E, Jewell DP, Wordsworth BP. The prevalence, clinical features and association of HLA-B27 in sacroiliitis associated with established Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29(2):193-7.
252. Cooke KR, Olkiewicz K, Erickson N, Ferrara JL. The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease. *J Endotoxin Res* 2002;8(6):441-8.
253. Caradonna L, Amati L, Magrone T, Pellegrino NM, Jirillo E, Caccavo D. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res* 2000;6(3):205-14.
254. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006;12(12):1365-71.
255. Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, *et al.* Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One* 2008;3(6):e2516.
256. Pastor Rojo O, Lopez San Roman A, Albeniz Arbizu E, de la Hera Martinez A, Ripoll Sevillano E, Albillos Martinez A. Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(3):269-77.
257. Reinisch W, Gasche C, Tillinger W, *et al.* Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. *Am J Gastroenterol* 1999;94(8):2156-64.

258. Louis E, Belaiche J, van Kemseke C, Franchimont D, de Groote D, Gueenen V, Mary JY. A high serum concentration of interleukin-6 is predictive of relapse in quiescent Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9(10):939-44.
259. Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M, *et al.* Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent. *Dig Dis Sci* 1995;40(5):949-59.
260. Choi ST, Kim JH, Kang EJ, Lee SW, Park MC, Park YB, Lee SK. Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(12):1775-9.
261. Bal A, Unlu E, Bahar G, Aydog E, Eksioglu E, Yorgancioglu R. Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2007;26(2):211-5.
262. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, *et al.* Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999;180(5):1584-9.
263. Schumann RR. Old and new findings on lipopolysaccharide-binding protein: a soluble pattern-recognition molecule. *Biochem Soc Trans*;39(4):989-93.
264. Schroder NW, Schumann RR. Non-LPS targets and actions of LPS binding protein (LBP). *J Endotoxin Res* 2005;11(4):237-42.
265. Hudgins LC, Parker TS, Levine DM, *et al.* A single intravenous dose of endotoxin rapidly alters serum lipoproteins and lipid transfer proteins in normal volunteers. *J Lipid Res* 2003;44(8):1489-98.
266. Hacquard-Bouder C, Falgarone G, Bosquet A, Smaoui F, Monnet D, Ittah M, Breban M. Defective costimulatory function is a striking feature of antigen-presenting cells in an HLA-B27-transgenic rat model of spondylarthropathy. *Arthritis and rheumatism* 2004;50(5):1624-35.
267. Fert I, Cagnard N, Glatigny S, *et al.* Reverse interferon signature is characteristic of antigen-presenting cells in human and rat spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*;66(4):841-51.
268. van der Meer JH, Netea MG, Dinarello CA. Modulation of muramyl dipeptide stimulation of cytokine production by blood components. *Clin Exp Immunol* 2009;156(3):428-33.
269. Traub S, Kubasch N, Morath S, Kresse M, Hartung T, Schmidt RR, Hermann C. Structural requirements of synthetic muropeptides to synergize with lipopolysaccharide in cytokine induction. *J Biol Chem* 2004;279(10):8694-700.
270. Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, *et al.* Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol* 2005;35(8):2459-70.
271. Sanchez-Cantu L, Rode HN, Christou NV. Endotoxin tolerance is associated with reduced secretion of tumor necrosis factor. *Arch Surg* 1989;124(12):1432-5; discussion 5-6.
272. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1995;181(5):1887-92.
273. Zuckerman SH, Evans GF, Butler LD. Endotoxin tolerance: independent regulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression. *Infect Immun* 1991;59(8):2774-80.
274. Yang ZX, Liang Y, Zhu Y, Li C, Zhang LZ, Zeng XM, Zhong RQ. Increased expression of Toll-like receptor 4 in peripheral blood leucocytes and serum levels of some cytokines in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol* 2007;149(1):48-55.
275. Fernandes ML, Mendes ME, Brunialti MK, Salomao R. Human monocytes tolerant to LPS retain the ability to phagocytose bacteria and generate reactive oxygen species. *Braz J Med Biol Res*;43(9):860-8.

-
276. Surdacki A, Sulicka J, Korkosz M, *et al.* Blood monocyte heterogeneity and markers of endothelial activation in ankylosing spondylitis. *The Journal of rheumatology*;41(3):481-9.
277. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis and rheumatism* 2012;64(3):671-7.
278. Chiu YG, Shao T, Feng C, Mensah KA, Thullen M, Schwarz EM, Ritchlin CT. CD16 (FcRgammaIII) as a potential marker of osteoclast precursors in psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther*;12(1):R14.
279. Thiesen S, Janciauskiene S, Uronen-Hansson H, Agace W, Hogerkorp CM, Spee P, Hakansson K, Grip O. CD14(hi)HLA-DR(dim) macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease. *J Leukoc Biol*;95(3):531-41.
280. Wijngaarden S, van Roon JA, Bijlsma JW, van de Winkel JG, Lafeber FP. Fcgamma receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patients with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(5):681-8.
281. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, *et al.* CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2002;46(10):2578-86.
282. Ziegler-Heitbrock HW, Strobel M, Kieper D, *et al.* Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood* 1992;79(2):503-11.
283. Cros J, Cagnard N, Woollard K, *et al.* Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*;33(3):375-86.
284. Nazareth N, Magro F, Silva J, *et al.* Infliximab therapy increases the frequency of circulating CD16(+) monocytes and modifies macrophage cytokine response to bacterial infection. *Clin Exp Immunol*;177(3):703-11.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Calin-Kriterien für die Klassifikation des entzündlichen Rückenschmerzes (1977).....	9
Abbildung 2:	Kriterien zur Beurteilung der röntgenologischen Sakroilitis (nach Bennett et al.; 1968)	10
Abbildung 3:	Modifizierte New York Kriterien (1984) für die Klassifikation der AS	11
Abbildung 4:	ESSG Kriterien (1991) für die Klassifikation der axSpA (AS und nrSpA) und der peripheren SpA	12
Abbildung 5:	ASAS Kriterien für die Klassifikation der axSpA (AS und nrSpA).....	12
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Bewertung struktureller Schäden an den Wirbelkörpern	14
Abbildung 7:	Die duale Rolle von LBP als Transportprotein für LPS	26
Abbildung 8:	Fragebogen zur Ermittlung des BASDAI (<i>Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index</i>)	36
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der Sandwich-ELISA Technik	42
Abbildung 10:	Schematische Darstellung der kompetitiven ELISA Technik	43
Abbildung 11:	Schematische Darstellung der Zellpopulation im FSC/SSC Dot-Plot (Durchflusszytometrie)	46
Abbildung 12:	Potenzielle Biomarker für die Diagnose der axSpA.....	59
Abbildung 13:	Potenzielle Biomarker für die Prognose der röntgenologischen Progression	64
Abbildung 14:	Quantifizierung von LPS (LAL-Assay), LBP und IL-6 im Serum (ELISA)	71
Abbildung 15:	Durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion CD68 ⁺ Monozyten im Vollblut.....	73
Abbildung 16:	Analyse der Zytokinproduktion von CD68 ⁺ Monozyten im Vollblut	74
Abbildung 17:	Quantifizierung von IL-10 in Überständen stimulierter Vollblut Proben	75
Abbildung 18:	Einfluss der Behandlung auf die Zytokinproduktion von Monozyten im Vollblut	78
Abbildung 19:	Phänotypische Analyse der Monozyten im Vollblut von axSpA-Patienten und Kontrollen	80
Abbildung 20:	Analyse der Monozyten-Subpopulationen anhand der CD14 und CD16 Expression.....	82
Abbildung 21:	Phagozytose von pHrodo gekoppelten e-coli Partikeln von CD14 ⁺ Monozyten im Vollblut.....	83

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der angewendeten Biologika bei Patienten mit axSpA	35
Tabelle 2:	Zusammensetzung der verwendeten Puffer.....	40
Tabelle 3:	Kommerzielle Komplettsysteme	40
Tabelle 4:	Zellstimulanzen	41
Tabelle 5:	Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie	41
Tabelle 6:	Übersicht über die verwendeten ELISA	44
Tabelle 7:	Übersicht der Fluorochrome der verwendeten Antikörper	47
Tabelle 8:	Zusammenfassung der verwendeten Antikörperlösungen für die phänotypische Charakterisierung der Monozyten im Vollblut (Färbung 1 -4)	47
Tabelle 9:	Überblick der verwendeten Stimulanzen (Liganden) für die Vollblutstimulation	49
Tabelle 10:	Überblick über die verwendeten Antikörper für den intrazellulären Nachweis.....	49
Tabelle 11:	Verwendete Software	51
Tabelle 12:	Probandencharakteristik.....	53
Tabelle 13:	Univariate Varianzanalysen (ANOVA) zur Bestimmung der Assoziation von klinischen und demografischen Parametern mit den Serumspiegeln der Biomarker	55
Tabelle 14:	Covarianz-Analyse (ANCOVA) zwischen den Biomarker-Konzentrationen und klinischen/ demografischen Parametern bei Patienten mit axSpA.....	56
Tabelle 15:	Quantitative Analyse von Serumproteinen bei Patienten mit axSpA und Kontrollen	57
Tabelle 16:	Übersicht über die Evidenz ausgewählter Serumproteine für die Diagnose einer axSpA	60
Tabelle 17:	Analyse von Biomarker-Konzentrationen im Serum von axSpA-Patienten in Abhängigkeit von der röntgenologischen Progression	62
Tabelle 18:	Berechnung der OR (p-Werte) von Risikofaktoren für die röntgenologische Progression bei axSpA Patienten	65
Tabelle 19:	Berechnung des Risikos (OR) für röntgenologische Progression auf Grundlage der ermittelten prädiktiven Werte (cut-off`s) ausgewählter Biomarker für axSpA Patienten.....	66
Tabelle 20:	Berechnung des Risikos (OR) für röntgenologische Progression auf Grundlage der ermittelten prädiktiven Werte (cut-off`s) ausgewählter Biomarker für axSpA Patienten mit Syndesmophyten zu Baseline	68
Tabelle 21:	Charakterisierung der Patienten (axSpA) und Kontrollen (Ko)	70
Tabelle 22:	Korrelationen der Serumparameter CRP, LPS, LBP und IL-6 bei Patienten mit axSpA	72
Tabelle 23:	Einfluss klinischer und demografischer Parameter auf die Zytokinproduktion der Monozyten.....	76
Tabelle 24:	Adjustierung der Analyse der spontanen und induzierten Zytokinproduktion der Monozyten.....	77
Tabelle 25:	Einfluss klinischer und demografischer Parameter auf die Zytokinproduktion der Monozyten von axSpA-Patienten mit Standard-Therapie (kontinuierliche oder bedarfsweise Einnahme von NSAR)	79

Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Prediction of radiographic spinal progression using biomarkers in patients with ankylosing spondylitis who are at high risk for progression, Poddubnyy D., Conrad K., Ruiz-Heiland G.; Ann Rheum Dis, 2012; 71 /Suppl 3):83

Elevated serum level of the vascular endothelial growth factor predicts radiographic spinal progression in patients with axial spondylitis, Poddubnyy D., Conrad K., Haibel H., Syrbe U., Appel H., Braun J., Rudwaleit M., Sieper J.; Ann Rheum Dis, 2012;64 (Suppl):S1054

***In vivo* pre-activation of monocytes in patients with axial spondyloarthritis**, Conrad K., Wu P., Sieper J., Syrbe U.; Arthritis Research & Therapy, 2015 Jul 16;17:179. doi: 10.1186/s13075-015-0694-2

Serum levels of markers of cartilage and bone metabolism in patients with axial spondyloarthritis: relation to clinical parameters and radiographic spinal progression, Conrad K., Poddubnyy D., Haibel H., Callhoff J., Sieper J., Uta Syrbe U.; Arthritis Research & Therapy, Arthritis & Rheumatism, vorbereitet zur Einreichung, 2015

Mitwirkung an weiteren Publikationen:

Adipokine serum levels in patients with ankylosing spondylitis and their relation to clinical parameters and radiographic spinal progression, Syrbe U., Callhoff J., Conrad K., Poddubnyy D., Haibel H., Junker S., Frommer KW., Müller-Ladner U., Neumann E., Sieper J.; Arthritis Rheumatol, 2014, [Epub ahead of print]

The role of dendritic cells in the pathogenesis of Whipple's disease, Schinnerling K, Geelhaar-Karsch A., Allers K., Friebel J., Conrad K., Loddenkemper C., Kühl AA., Erben U., Ignatius R., Moos V., Schneider T.; Infect Immun. 2014 Nov 10. pii: IAI.02463-14. [Epub ahead of print]

Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis, Turina MC., Sieper J., Yeremenko N., Conrad K., Haibel H., Rudwaleit M., Baeten D., Poddubnyy D.; Ann Rheum Dis. 2014 Sep;73(9):1746-8. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205506. Epub 2014 May 20

Macrophages accumulate in the gut mucosa of untreated HIV-infected patients, Allers K., Fehr M., Conrad K., Epple HJ., Schürmann D., Geelhaar-Karsch A., Schinnerling K., Moos V., Schneider T.; J Infect Dis. 2014 Mar 1;209(5):739-48. doi: 10.1093/infdis/jit547. Epub 2013 Oct 16.

Evaluation of arginine metabolism for the analysis of M1/M2 macrophage activation in human clinical specimens, Geelhaar-Karsch A., Schinnerling K., Conrad K., Friebe J., Allers K., Schneider T., Moos V.; Inflamm Res. 2013 Sep;62(9):865-9. doi: 10.1007/s00011-013-0642-z. Epub 2013 Jun 18.

Regulatory T cells in patients with Whipple's disease, Schinnerling K., Moos V., Geelhaar A., Allers K., Loddenkemper C., Friebe J., Conrad K., Kühl AA., Erben U., Schneider T.; J Immunol. 2011 Oct 15;187(8):4061-7. doi: 10.4049/jimmunol.1101349. Epub 2011 Sep 14.

Tagungsbeiträge:

Conrad K., Poddubnyy D., Sieper J., Syrbe U. *“Reduced LPS-induced IL-6 production by monocytes in whole blood stimulations in patients with Ankylosing Spondylitis”*, Posterbeitrag auf dem Europäischen Rheuma-Kongress (EULAR - European League against Rheumatism) in Madrid (Spanien), 2013

Conrad K., Poddubnyy D., Sieper J., Syrbe U. *„Biomarkeranalyse in Patienten mit nicht-röntgenologischer und röntgenologischer axialer SpA“*, Posterbeitrag auf dem 41. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh) in Mannheim (Deutschland), 2013

Danksagung

Die Erstellung einer Doktorarbeit ist nie das Werk einer Einzelperson. Deshalb ist es an der Zeit mich bei all denen zu bedanken, die maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Herrn Prof. Dr. Joachim Sieper möchte ich für die freundliche Überlassung des interessanten Forschungsthemas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Volk für die freundliche Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Uta Syrbe für die Freiheit, die sie mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Ihr kompetenter Rat und ihre Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute.

Ebenso gilt mein Dank den Studienschwestern Beate Buß und Annegret Langdon, sowie den Rheumatologen Dr. Denis Poddubnyy, Dr. Inge Spiller, Dr. Hiltrun Haibel, Dr. Henning Brandt, Dr. Nina Kempiners, Dr. In-Ho Song und dem Team der Rheuma-Ambulanz für die tatkräftige Unterstützung bei der Rekrutierung und Aufklärung der Patienten, der Begutachtung der Röntgenbilder und der Erhebung der Patienten-Daten.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine unermüdliche Assistentin Peihua Wu für ihre Hilfe und ihren Einsatz bei der Vorbereitung und Durchführung der Experimente. Mein Dank geht auch an das Team des Rheuma-Labors: Rene Maier, Adelheid Ditten und Petra Rudwaleit für die herzliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Ulrike Erben, Dr. Verena Moos, Dr. Kristina Allers und Diana Bösel für ihre konstruktiven Ideen, wertvollen Diskussionen und ihre kompetente fachliche Unterstützung bedanken.

Meiner Kollegin und Freundin Dr. Anika Geelhaar-Karsch danke ich für die endlosen Diskussionen, Versuchsplanungen und Interpretationen der Daten auf unseren täglichen gemeinsamen Fahrten und auch darüber hinaus. Du hast maßgeblich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Meiner Freundin Michaela Drechsel und meiner Schwester Susanna Low danke ich ganz besonders für die emotionale Unterstützung in all den Jahren und das sehr aufwendige Redigieren meiner Arbeit.

Der größte Dank jedoch geht an meine Kinder Laura und Leon Conrad und meinen Freund Steffen Bäther. Ich kann euch gar nicht genug danken, dass ihr mich immer unterstützt und meine häufige physische und psychische Abwesenheit toleriert habt. Danke, dass ihr mir so viele Aufgaben abgenommen und mich auch schlecht gelaunt und gestresst ertragen habt.

Eigenständigkeitserklärung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich habe mich auswärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 06. Juli 2009.

.....

Datum/Unterschrift